

이학석사 학위논문

세루로즈 용해성 점액세균
*Sorangium cellulosum*의 분리
및 대사산물에 관한 연구

Isolation and structure elucidation of bioactive
secondary metabolites of *Sorangium cellulosum*,
cellulose-degrading myxobacteria

2008년 2월

한 국 해 양 대 학 교 대 학 원

해양생명환경학과 해양생물공학전공

유 태 경

이학석사 학위논문

세루로즈 용해성 점액세균
*Sorangium cellulosum*의 분리
및 대사산물에 관한 연구

Isolation and structure elucidation of bioactive
secondary metabolites of *Sorangium cellulosum*,
cellulose-degrading myxobacteria

지도교수 안 종 응

2008년 2월

한 국 해 양 대 학 교 대 학 원

해양생명환경학과 해양생물공학전공

유 태 경

본 논문을 유태경의 이학석사 학위논문으로 인준함.

위원장 이학박사 김 영 섭 인

위 원 공학박사 손 병 일 인

위 원 농학박사 안 중 응 인

2007년 11월

한국해양대학교 대학원

목 차

	Page
List of tables	iii
List of figures	iv
Abbreviations	vi
List of symbols	viii
Abstract	1
I. 서론	3
II. 실험재료 및 방법	9
1. 세루로즈 용해성 점액세균의 분리 및 배양	9
1.1 세루로즈 용해성 점액세균의 분리와 순화	9
1.2 세루로즈 용해성 점액세균의 배양	12
2. 대사산물의 추출 및 분리 정제	14
2.1 추출 및 분획	14
2.2 분리 정제	16
2.3 기기분석	17

3. 생물활성측정	18
3.1 항균활성	18
3.2 항산화활성 (ORAC assay)	19
3.3 세포독성	20
III. 결과 및 고찰	22
1. 세루로즈 용해성 점액세균의 분리 및 동정	22
1.1 세루로즈 용해성 점액세균의 분리	22
1.2 세루로즈 용해성 점액세균의 동정	24
2. 세루로즈 용해성 점액세균의 대사산물의 스크리닝	29
3. <i>S. cellulosum</i> KM1041의 대사산물의 분리정제, 구조결정 및 생물활성	33
4. <i>S. cellulosum</i> KM1001의 대사산물의 분리정제, 구조결정 및 생물활성	53
IV. 결 론	65
V. 부 록	67
VII. 참고 문헌	91
감사의 글	97

List of tables

	Page
Table 1. Myxobacterial strains isolated from soil samples -----	23
Table 2. Screening of myxobacteria for antimicrobial substances -----	30
Table 3. Physico-chemical properties of compound 1 -----	35
Table 4. ¹ H, ¹³ C NMR data and principal gHMBC correlations of compound 1 -----	40
Table 5. ¹ H, ¹³ C NMR data and principal HMBC correlations of compound 2 -----	49
Table 6. Physico-chemical properties of compounds 4 and 5 -----	55
Table 7. ¹ H, ¹³ C NMR data and principal HMBC correlations of compound 4 -----	62
Table 8. Antioxidant activities of the soraphinol C and 4-hydroxylsattabacin --	64

	List of figures	Page
Fig. 1.	Myxobacterial fruiting bodies. -----	5
Fig. 2.	Selected structures of secondary metabolites from myxobacteria. --	7
Fig. 3.	Work-up procedure of <i>Sorangium cellulosum</i> isolates. -----	15
Fig. 4.	Key to the fruiting body types of mxobacteria. -----	24
Fig. 5.	Swarm colony of <i>Sorangium cellulosum</i> on filter paper on ST21CX agar. -----	26
Fig. 6.	Swarm colony of <i>Sorangium cellulosum</i> on KAN 4 agar. -----	27
Fig. 7.	Swarm colony of <i>Sorangium cellulosum</i> on Vy2 agar. -----	28
Fig. 8.	Isolation of compounds 1-3 from <i>S. cellulosum</i> KM1041. -----	34
Fig. 9.	¹³ C NMR spectrum of compound 1. -----	36
Fig. 10.	¹ H NMR spectrum of compound 1. -----	37
Fig. 11.	Partial structure of compound 1. -----	38
Fig. 12.	¹ H NMR and UV spectra of epothilone A. -----	39
Fig. 13.	The structure of epothilone A. -----	41
Fig. 14.	¹³ C NMR spectrum of compound 2. -----	42
Fig. 15.	DEPT spectrum of compound 2. -----	43
Fig. 16.	¹ H- ¹ H COSY spectrum of compound 2. -----	44
Fig. 17.	HMBC spectrum of compound 2. -----	45
Fig. 18.	TLC of the reaction product after alkaline-hydrolysis of compound 2. -----	46

Fig. 19.	^1H NMR spectrum of palmitoleic acid. -----	47
Fig. 20.	The structures of compounds 2 and 3. -----	50
Fig. 21.	Cytotoxicity of epothilone A against HM7 and HeLa cells. -----	51
Fig. 22.	Microtubule cytoskeleton in the presence of epothilone A and taxol. -----	52
Fig. 23.	Isolation of the compounds 4 and 5 from <i>S. cellulorum</i> KM1001. -----	53
Fig. 24.	^{13}C NMR spectrum of compound 4. -----	56
Fig. 25.	^1H NMR spectrum of compound 4. -----	57
Fig. 26.	^1H - ^1H COSY spectrum of compound 4. -----	58
Fig. 27.	gHMBC spectrum of compound 4. -----	59
Fig. 28.	^1H NMR spectrum of compound 5. -----	60
Fig. 29.	The structures of compounds 4 and 5 -----	63

List of abbreviations

[α] _D	: specific optical rotation
aq.	: aqueous
calcd.	: calculated
¹³ C NMR	: carbon 13 nuclear magnetic resonance
CH ₂ Cl ₂	: methylene chloride
concd.	: concentrated
COSY	: homonuclear correlation spectroscopy
DEPT	: distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO	: dimethylsulfoxide
EtOAc	: ethyl acetate
EtOH	: ethyl alcohol
Ex.	: extract
¹ H NMR	: proton nuclear magnetic resonance
HMBC	: heteronuclear multiple-bond connectivity
HMQC	: heteronuclear multiple-quantum connectivity
HPLC	: high performance liquid chromatography
HRFAB	: high resolution fast atom bombardment
HRESI	: high resolution electrospray ionization
Hz	: herz (sec ⁻¹)
IHD	: index of hydrogen deficiency
<i>iso</i> -PrOH	: isopropyl alcohol
IR	: infrared
LRFAB	: low resolution fast atom bombardment
LRESI	: low resolution electrospray ionization
MeOH	: methyl alcohol
m.p.	: melting point
MPLC	: medium pressure liquid chromatography

<i>n</i> -BuOH	: n-butyl alcohol
MS	: mass spectroscopy
NOESY	: nuclear overhauser enhancement spectroscopy
ORAC	: oxygen radical absorbance capacity
THF	: tetrahydrofuran
TLC	: thin layer chromatography
UV	: ultraviolet
ν_{\max}	: maximum frequency
λ_{\max}	: in UV spectroscopy, the wavelength maximum absorption

List of symbols

J	Coupling constant (Hz)
M^+	Molecular ion
m/z	Mass to charge
R_f	Rate of flow
δ	Chemical shift
cm^{-1}	Wave number
G	Gravity force
kbp	Kilobase pair
rpm	Revolutions per minute
t_R	Retention time

Isolation and structure elucidation of bioactive secondary metabolites of *Sorangium cellulosum*, cellulose-degrading myxobacteria

Tae-Kyung Yu

Department of Marine Bioscience and Environment, Graduate School,

Korea Maritime University, Busan, Korea

(Advisor: Professor Jong-Woong Ahn)

Abstract

Myxobacteria are unique gram-negative bacteria characterized by the gliding and fruiting body forming nature. They have recently been well established as a new and potent source for natural products with biological activities because of their potential to produce a considerable variety of metabolites.¹⁻⁴⁾ Thus, myxobacteria especially attract many researchers, since they have many possibilities of producing undiscovered bioactive substances.⁵⁾ They are not obtained by the routine method used in culturing bacteria and thus require

special techniques for their isolation and culture. We established in these techniques about *Sorangium cellulosum* in Korea.

In our search for the bioactive metabolites from myxobacteria, strains KM1001 and KM1041 of *Sorangium cellulosum*, were found to produce potent bioactive compounds. They were isolated and purified by silica gel column chromatography and semi-preparative HPLC. The structures of these compounds were determined on the basis of combined spectroscopic analysis.

Epothilone A (1)⁶⁻⁸⁾ from *S. cellulosum* KM1041 shown to have a significant cytotoxicity against the HM7 and HeLa human cancer cell lines with IC₅₀ values 20 and 30nM. At higher concentrations of epothilon A, the microtubules became arranged in bundle-like formations at the periphery of the cell.⁹⁻¹³⁾ The major component from *S. cellulosum* KM1001, named soraphinol C(4)¹⁴⁻¹⁶⁾ was found to be a new compound closely related to the minor component, 4-hydroxysattabacin (5).¹⁷⁾ Soraphinol C (4) showed antioxidant activity comparable to that of Trolox, while 4-hydroxylsattabacin (5) possessed only a weak antioxidant activity.

Keywords: Myxobacteria, *Sorangium cellulosum*, Soraphinol C, Epothilone A, Cytotoxicity, Antioxidant activity

I. 서론

천연물의 탐색과 이용에 관한 연구는 유기체의 생합성 능력을 탐색하고 이용하는 것으로서 지금까지 주로 식물과 미생물이 그 대상의 주종을 이루어 왔다. 특히 미생물은 플레밍의 페니실린 발명 이후 종 다양성과 짧은 세대 기간, 대량 생산의 용이성 등의 장점으로 많은 과학자들의 관심을 받고 있으며, 이들은 식물과 함께 생리활성물질의 탐색에 중요한 소스가 되고 있다. 지금까지 알려진 15,000여종의 미생물 기원의 생리활성물질은 약 70%가 방선균에서 분리되었고 20%가 진균류 (중에서도 deuter-, asco-, basidiomycetes가 주종)에서 나머지 10% 정도가 *Bacillus* 및 *Pseudomonas*를 주축으로 한 세균류에서 분리되었음을 볼 때¹⁸⁾ 생리활성물질의 자원이 된 미생물은 극소수의 group에 한정되어 있음을 알 수 있다.

이들을 대상으로 한 신물질 탐색연구는 점차 기지물질의 재분리로 그치는 경우가 많아 연구에 소요되는 비용과 시간이 기하급수적으로 증가하게 되는 실정이다. 이로 인해 관련 연구자나 기업들에게 효과적인 신물질 탐색을 위한 새로운 자원의 필요성이 대두되었다.¹⁹⁾ 그래서 특이한 생활사와 타 세균보다 큰 유전자 크기를 가지며 또한 현재 주목을 받고 있는 항암제인 epothilone을 생산하는 것으로 보고 된 세루로즈 용해성 점액세균을 새로운 자원으로 선택하였다.

(1) 새로운 자원으로서의 Myxobacteria

Myxobacteria는 gram-negative의 토양박테리아로 두께는 0.6-1.2 μm 이며, 길이는 대략 3-15 μm 인 막대기 모양의 간균이다. 이 박테리아는 절대호기성균으

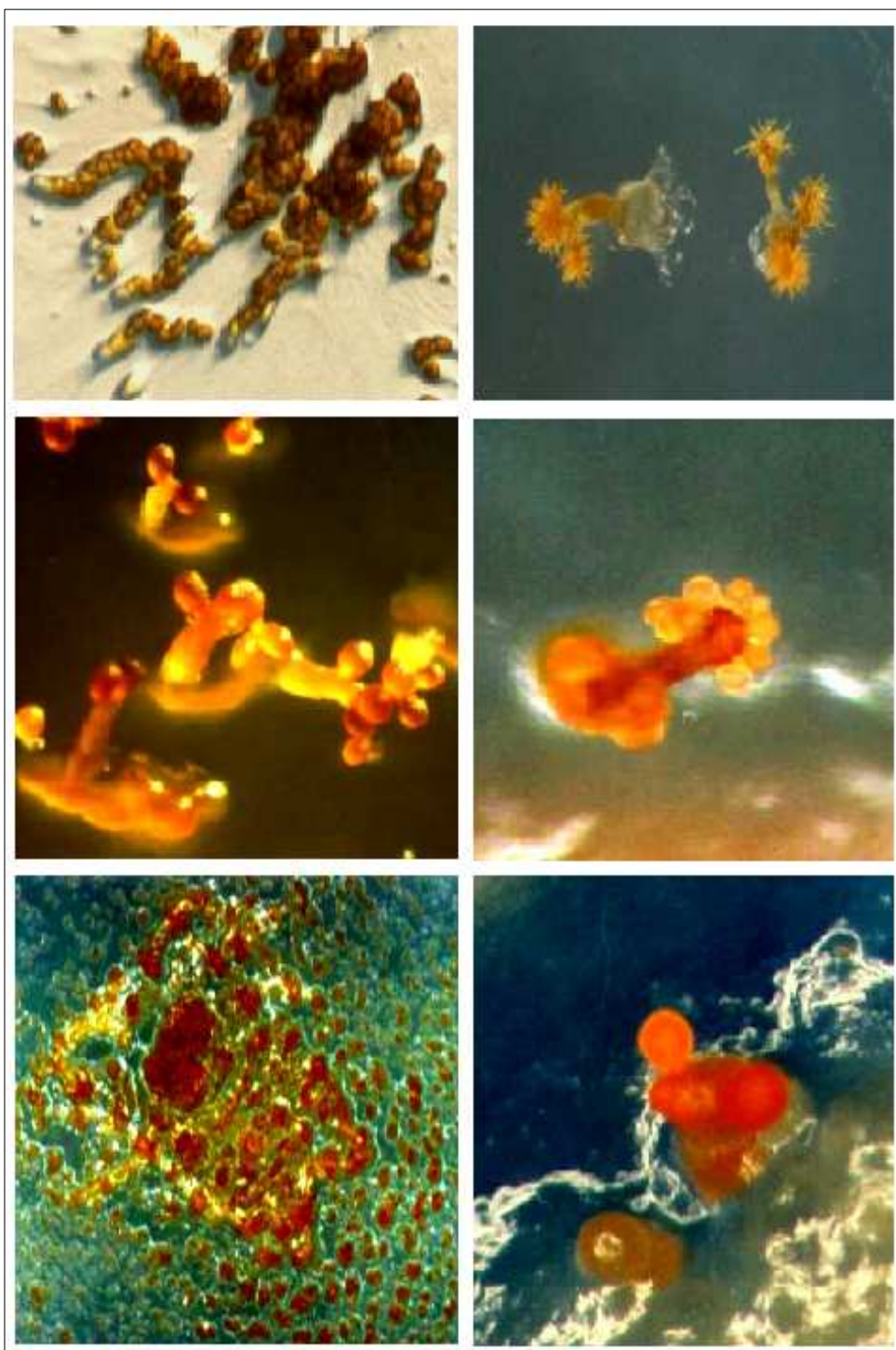
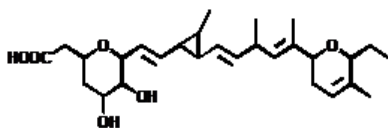


Fig. 1. Myxobacterial fruiting bodies.

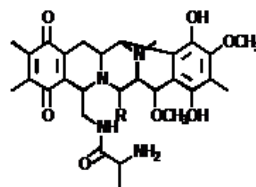
로 12속 35종이 알려져 있으며, proteobacteria δ 그룹에 속한다. Myxobacteria는 활주운동에²⁰⁾ 의해 이동하는 관계로 집락이 고체 표면에 얇은 막처럼 넓게 펼쳐져 있는 모습이며, 영양분이 결핍된 상황에서는 수십만 마리의 박테리아가 모여 자실체를 형성하는데, 각각의 박테리아는 그 안에서 구형 또는 타원형의 포자로 변형된다. 점액세균은 박테리아에서는 가장 큰 유전체를 가지고 있는 것으로 알려져 있는데, 대략 9,500-10,000kbp로 대장균의 두 배가 넘는 크기이다. 점액세균은 그 생활사에서 다른 박테리아와는 구별되는 두 가지 특성을 보이는데, 군집생활²¹⁾과 조직적인 다세포 자실체의 형성이 그것이다.

점액세균은 토양, 초식동물의 분변, 썩은 식물체나 나무껍질의 표면 등에서 서식하며 주위의 유기물질을 이용해서 자라거나 다른 미생물들을 잡아먹음으로서 생활한다. 이들은 수십만 마리에서 수억 마리 이상씩 군집을 이루어 살면서 활주 운동에 의해 먹이를 찾아 이동한다. 주변에 먹이가 많은 경우에는 여러 가수분해 효소, 항생물질들을 세포 밖으로 배출함으로서 이들 영양분을 분해 이용한다.

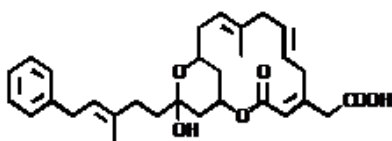
이러한 영양분이 더 이상 이용가능하지 않거나, 주변 환경이 나빠지면 수십만 마리씩 군집을²²⁾ 이룬 박테리아들이 한 점으로 모여 흡사 버섯과 같은 모양의 자실체 구조물을 형성하며 각각의 박테리아 세포들은 이 자실체 구조물 안에서 구형 또는 타원형의 포자로 변형 된다 (Fig. 1). 수십만 마리의 박테리아가 조직적으로 뭉쳐 이루어진 이들 자실체의 모양은 점액세균의 종류에 따라 구형, 반구형, 여러 종류의 버섯모양, 나무모양 등 아주 다양하다. 이러한 조직적인 자실체의 형성은 원핵생물 안의 다른 박테리아에서는 전혀 찾아볼 수 없고 진핵생물인 *Dictyostellium*의 생활사에서 그 유사성을 발견할 수 있다. 자실체 내의 포자들은 다시 영양분이 풍부한 상황이 되면 일시에 발아하게 되는데, 그 결과로 발아된 박테리아들은 곧바로 수십만 마리의 집단을 형성하여 군집에 의한 생활을 계속하게 된다.



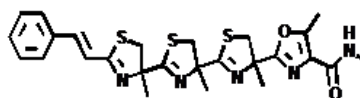
Ambruticin



Saframycin



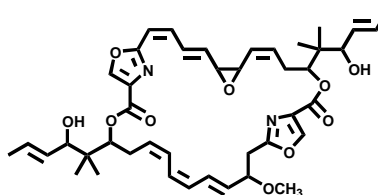
Ripostatin



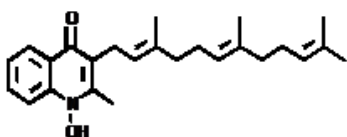
Thiangazol



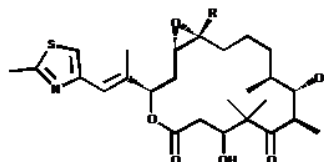
Myxalamid



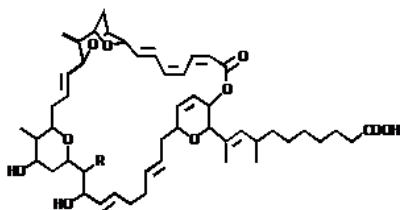
Disorazole A₁



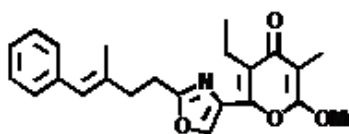
Aurachin



Epothilone



Sorangicin



Phenoxan

Fig. 2. Selected structures of secondary metabolites from myxobacteria.

(2) 점액세균이 생산하는 생물활성물질

점액세균은 주변 환경에서 영양분을 섭취하기 위하여 protease, nuclease, lipase, glucanase 등의 세포 외 효소를 생산하여 다른 미생물을 공격하며 그 외에 영양분 섭취를 용이하게 하기 위하여 starch, xylan, chitin, cellulose 등을 분해하는 효소들과 restriction endonuclease, reversed transcriptase, protein kinase 등을 생산한다.²³⁾ 점액세균의 생물활성물질의 대부분은 소수성이며 선형 또는 환형의 polyketide 및 peptide이다.²⁴⁾ 많은 물질들이 polyketide에 아미노산이 결합되어 있는 형태이며, 종종 heterocycle을 형성하기도 한다 (Fig. 2).²⁵⁻³¹⁾ 이들 생물활성물질의 대부분은 항균, 항암, 항생제 활성을 갖고 있기 때문에 의학적 목적으로 연구들이 진행되고 있다. 그리고 많은 물질들이 분리되어 구조와 기능이 밝혀졌으며 그 양상은 매우 다양하게 나타나고 있다. 그 중에는 원핵생물 단백질합성 저해물질, 진핵생물 단백질합성 저해물질, gram-positive균의 K^+ 이온 배출촉진물질, gram-negative균 DNA 결합물질 등이 있고, 기작이 확실히 밝혀지지 않은 물질로 높은 세포독성을 나타내는 vioprolid, 항균효과가 있는 leupyrrin³²⁾ 등이 있다. 다른 종류의 2차 대사산물을 생산하는 미생물들과 마찬가지로 점액세균의 경우도 생물활성물질을 종특이적으로 생산하는 것이 아니라 특정 균주에서만 생산하는 특징을 갖고 있다. 또한 모든 점액세균들이 생물활성물질을 다양하게 생산하는 것은 아니다. 아직 많은 연구가 이루어지지 않은 점액세균은 수많은 독특한 기작을 가진 생물활성물질의 보고이며 새로운 생합성의 기작을 가지고 있을 것으로 사료됨으로써 많은 연구자들의 흥미를 자극하고 있다.

본 실험에서는 점액세균이 생산하는 새로운 생물활성물질을 찾기 위해 먼저 세루로즈 용해성 점액세균의 분리 및 배양에 관한 방법을 국내 최초로 자체 확립하고, 그 방법을 이용해 국내 토양으로부터 분리한 점액세균의 대

사산물을 대상으로 각종 생물활성 시험을 하여 특이성이 있거나 높은 활성을 가진 균주를 선별한 후, 그 대사산물로부터 활성본체를 분리 정제하여 화학구조를 규명하였다.

II 실험재료 및 방법

1. 세루로즈 용해성 점액세균의 분리 및 배양

1.1 세루로즈 용해성 점액세균의 분리 및 순화

(1) 토양 시료 채집

경기도 안산, 용인 그리고 경상북도 김천 소재의 직지사, 직지천 부근, 덕천리의 나대지 지역에 위치한 배밭, 포도밭, 고추밭, 배추밭 및 과수원 토양의 흙을 채집하였다. 시료 채집 시 지표면의 흙을 걷어낸 상태에서 5cm 정도의 깊이까지의 흙을 일정한 간격으로 이동하면서 지역별로 채취하였다. 채취한 시료는 바로 사용하지 않을 경우, 곰팡이의 증식을 억제하기 위해 햇빛이 들지 않는 서늘한 곳에서 건조시켜 보관하였으며, 균 순화 시 지역별로 일정한 수를 선별하여 실험에 사용하였다.

(2) 토양 시료 처리

ST21CX agar 배지에 종이를 일정한 크기 (직경10cm)로 잘라서 멸균하였다. 세루로즈 용해성 점액세균의 분리에 필요한 배지는 멸균한 종이를 배지 위에 올려 준비하였다. 토양 시료는 일정한 양을 깨끗한 종이에 덜어서 멸균 증류수를 3~4방울 떨어뜨려 시료가 분산되지 않도록 하였다. 시약 스폰을 이용하여 직경 0.3~0.5cm 크기로 시료를 뭉쳐 종이 중앙에 한 점씩 올려놓았다. 토양 시료를 처리한 배지는 incubator (29℃)에서 배양을 하였으며, 시료

처리 후 30일 동안 쌍안실체현미경으로 균의 성장 유무 관찰하였다.

(3) 세루로즈 용해성 점액세균의 분리 및 순화

토양 시료를 처리하고 7-15일 동안 배양 하였을 때 나타나는 자실체나 또는 용해된 여과지의 일부분을 ST21CX agar 배지로 옮겼으며, 이때 멸균한 종이의 크기는 시료를 올렸던 크기보다 작은 3x1cm의 크기로 준비를 하였다. 이러한 방법으로 ST21CX agar 배지를 이용하여 동일한 순화조작을 여러 번 거치면서 혼재된 곰팡이와 세균으로부터 세루로즈 용해성 점액세균을 분리하였다.

세루로즈 용해성 점액세균을 순수하게 분리하기위해 KAN 4 agar 배지를 이용하였다. KAN 4 agar 배지에 세루로즈 용해성 점액세균의 먹이균으로 *E. coli*을 이용하여 circular patch를 만들었으며, 성장하는 swarm이나 자실체를 현미경을 통하여 분리 하였다. 이때 먹이균으로 사용한 *E. coli*는 다음과 같은 방법으로 배양을 하였다.

냉장 보관되어있는 *E. coli*를 nutrient agar배지에 선 도말하여 29℃에서 24시간 incubator에서 활성화 시켰다. L'튜브에 nutrient broth배지를 10ml 넣어 멸균시킨 후, 활성화 시켜 둔 *E. coli*를 배지에 접종하여 30℃의 shaking water bath (120rpm)에서 16시간 동안 진탕배양 하였다. 1ℓ의 nutrient broth배지에 overnight시킨 *E. coli* 10ml (0.1% seed culture)을 무균적으로 접종한 후 shaking incubator (30℃, 160rpm)에서 16시간 배양 후 수확하였다. 수확은 원심분리 (4℃, 10000G, 20min)를 통하여 배지 성분인 상등액과 균체를 분리하였다. 균체를 하나의 용기에 모은 다음 0.2% NaCl로 세척한 후 물기를 제거한 균체는 냉장보관 하였다.

배양한 먹이균 (*E. coli*)은 멸균 증류수로 5배 희석하여 멸균 (121℃, 15min)하였다. 멸균된 *E. coli* 현탁액을 KAN 4 agar배지 위에 micro-pipet으로 100

μl 씩 올려 직경 1.2~1.5cm의 원형의 patch를 만든 후 앞서 ST21CX agar배지에서 분리한 세루로즈 용해성 점액세균을 여기에 접종하였다. Incubator (29℃)에서 배양하면서 현미경으로 점액세균의 swarm 및 자실체 형태와 성장 정도를 관찰하였다. 이러한 방법으로 2~3차례 반복하여 분리조작을 거치는 동안 완전히 순화된 점액세균의 swarm이나 자실체가 얻어지면 무균적으로 Vy2 agar배지로 옮겨 배양함으로써 순화과정을 마쳤다.

1.2 세루로즈 용해성 점액세균의 배양

(1) 고체배양

KAN 4 agar배지의 circular patch에서 순화 된 세루로즈 용해성 점액세균을 Vy2 agar배지에 무균적으로 접종하여 증식시키면서 swarm의 색이나 자실체의 형태 등 그 특성을 관찰 하였다. 일정한 양으로 자란 균은 균체양을 확보하기 위해서 새로운 Vy2 배지에 선 도말 하였으며, B.O.D incubator (29℃)에서 배양하였다. 이 중 타 균으로부터 오염이 없으며, 성장 속도가 우수한 균주를 선발하여 액체배양을 실시하였고 일부는 액체질소에 보관하였다.

(2) 액체배양

① 예비배양

대량 배양하기 위한 균 선정을 위해 순화한 균에 대해 예비배양을 실시하였다. 예비배양을 통하여 균체의 색과 배양상의 특성 및 성장 속도 등을 실험하여 우수한 특성과 물질생산 등을 가진 균주를 선별하였다.

예비배양은 *Sorangium cellulosum*용 액체 배지를 사용하였으며, 총 0.8ℓ 기준으로 30℃의 shaking incubator (160rpm)에서 10일간 배양하였다. 예비 배양을 통하여 획득한 균체와 흡착제 XAD-16을 수확, 추출 및 분획 처리를 하여 TLC 및 생물활성실험을 실시하였다.

② 종배양

종배양은 두 번에 걸쳐 실시하였다. 1차 종배양은 *Sorangium cellulosum*용 액체 배지 50ml (300ml-flask)에 고체배지에서 배양한 균체를 seed로 사용하여 배양하였다 (30℃, 160rpm, 120h). 2차 종배양 역시 동일한 배지를 사용하

였으며, 1차 종배양한 균체를 seed로 이용하였다. micro-pipet으로 균체 위주로 5ml씩 접종하였고, 1차 종 배양과 동일한 환경조건 (30℃, 160rpm, 120h)으로 배양하였다.

③ 대량배양

대량배양은 종배양과 동일한 *Sorangium cellulosum*용 액체 배지에 흡착합성수지 XAD-16을 6g 첨가하여 사용하였으며, 400ml (2ℓ -flask)씩 총 14ℓ를 배양하였다. 종배양과 동일한 방법으로 접종 전 멸균한 Glucose를 4ml씩 micro-pipet으로 첨가하였다. 종배양의 균체를 seed로 사용하여 micro-pipet으로 8ml씩 접종한 후 shaking incubator (30℃, 160rpm)에서 10일간 배양하였다.

④ 수확

10일간 (240h)배양 된 세루로즈 용해성 점액세균은 pH를 측정한 후 100mesh체에 걸러 XAD와 균체를 배양액과 분리시켰다. 배양액은 원심분리 (10000G, 20min, 4℃)하여 상등액은 버리고 배양액에 남아 있는 균체를 모았으며 이들 균체는 sieving 통하여 모은 균체 그리고 XAD와 합하여 추출을 하였다.

2. 대사산물의 추출 및 분리 정제

2.1 추출 및 분획

(1) 추출

배양액으로부터 분리시킨 균체와 XAD를 acetone으로 실온에서 6시간 동안 추출 하였으며, 추출용매에서 분리한 균체와 XAD는 다시 acetone으로 6시간 동안 추출을 하였다. Acetone 추출물은 rotary evaporator로 농축하여 분획을 실시하였다 (Fig. 3).

(2) 분획

추출물은 H₂O층과 EtOAc층으로 분획하였다. EtOAc층은 sodium sulfate anhydrous를 처리하여 건조시킨 후 농축한 다음, 이 농축물을 MeOH과 *n*-heptane을 이용하여 재분획하였다. MeOH층은 농축 후 칼럼 크로마토그래피 방법을 이용하여 분리하였다.

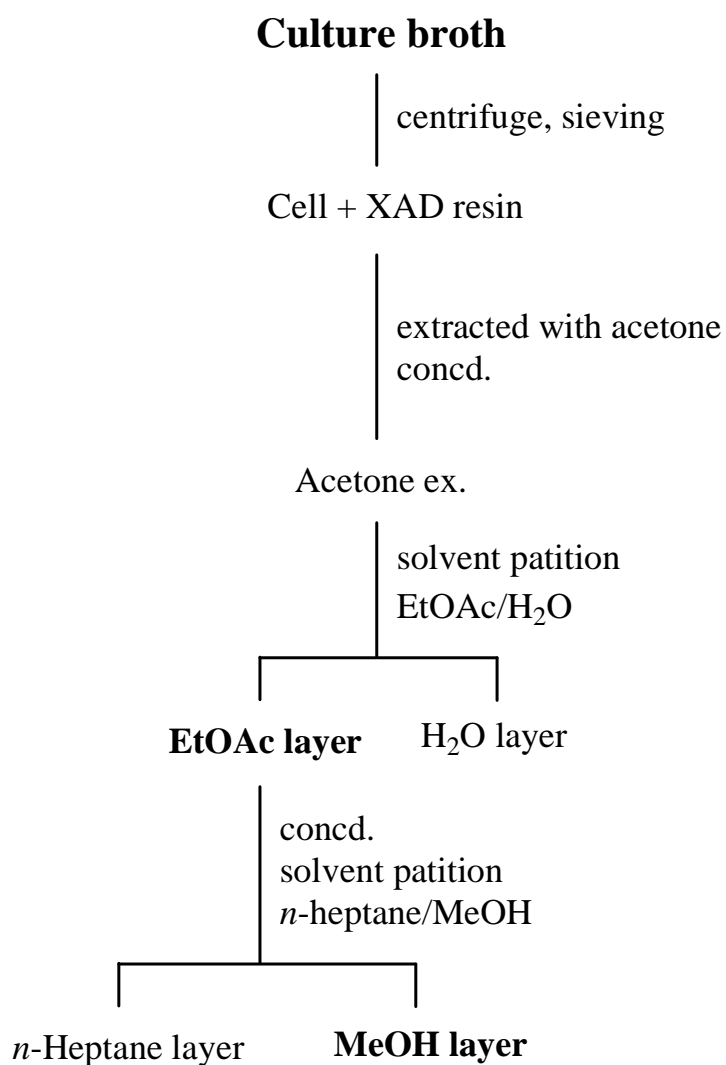


Fig. 3. Work-up procedure of *Sorangium cellulosum* isolates.

2.2 분리 정제

(1) TLC

TLC에 물질을 spot한 후 선택된 용매계로 전개를 하였다. 254nm와 365nm의 UV파장에서 흡수를 관찰한 다음 여러 가지 발색시약을 사용하여 TLC 상에서 각각의 물질의 발색시약에 의해 나타내는 색을 관찰하였다.

발색시약으로는 Vanillin-황산액, Ninhydrin액, Dragendorff액, FeCl₃액, Anisaldehyde-salphuric acid액을 사용하였으며, Vanillin-황산액은 EtOH 300ml에 황산 3ml 용액에 vanillin 9g을 넣어 시약을 제조하였고, 발색시약을 분무한 후 열을 가하여 타는 색을 육안으로 관찰하였다. Ninhydrin액은 Ninhydrin 0.3g을 *n*-BuOH 100ml에 녹인 다음 여기에 초산 3ml을 가한 용액을 분무 후 가열하였다. Dragendorff액은 0.85g의 basic bismuth nitrate를 10ml의 빙초산이 함유된 40ml의 증류수에 녹인 후 여기에 8g의 KI를 녹인 20ml 증류수를 가한 용액을 분무하여 나타나는 색을 관찰 하였다. FeCl₃액은 10% aq. solution을 분무 후 건조하여 나타나는 색을 관찰하였다.

(2) 칼럼 크로마토그래피

칼럼 크로마토그래피에 사용한 고정상이 되는 충진제로는 silica gel, RP-18, sephadex LH-20을 이용하였고, 칼럼은 2x30cm, 3x30cm 크기를 사용하였다.

순상 크로마토그래피의 충진제는 silica gel를 사용하였으며 용매는 *n*-hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, Acetone, MeOH을 이용하여 혼합물 분리에 사용하였다. 역상 크로마토그래피는 LiChroprep RP-18 충진제를 사용하였고 용매는 MeOH, H₂O, *iso*-PrOH, THF를 이용한 용매계로 분리하였다. 또한 size exclusion 크로마토그래피로서 sephadex LH-20를 이용하였다.

(3) MPLC

실험에 사용한 MPLC (YFLC-5404, Yamazen)는 Universal UV-detector가 장착된 것으로서, column은 LiChroprep Si 60과 LiChroprep RP-18을 사용하였다 (부록 참조).

(4) HPLC

Diode array detector HPLC를 사용하였으며, 분석 용 칼럼은 CAPCELL PAK C18 (UG120, 5 μ m; 4.6mm I.D.x250mm, SHISEIDO), YMC-Pack SIL (5 μ m, 12nm; 4.6mm I.D.x250mm), YMC-Pack Diol -120-NP (5 μ m, 12nm; 4.6mm I.D.x150mm)을 사용하였다.

Semi-preparative HPLC는 분석 할 때와 동일한 기기를 사용하였으며, 분취 칼럼으로는 CAPCELL PAK C18 (UG120 Å, 5 μ m; 10mm I.D.x250mm, SHISEIDO), YMC-Pack SIL (5 μ m, 6nm; 10mm I.D.x250mm), YMC-Pack Diol -120-NP (5 μ m, 12nm; 20mm I.D.x150mm)를 사용하였다.

2.3 기기분석

¹H-NMR과 ¹³C-MMR, two-dimension NMR data는 Varian UNITY 500 spectrometer과 JNM ECP-400 spectrometer로 측정하였다. Optical rotation은 JASCO P-1020 polarimeter, UV spectrum은 Agilent 8453 spectrophotometer, IR spectrum은 Bruker IFS-66/S FTIR spectrometer로 측정하였으며 ESIMS는 Agilent 1100LC/MSD trap SL mass spectrometer를 사용하였고 HRESIMS는 high resolution tandem mass spectrometer를 사용하여 측정하였다.

3. 생물활성측정

3.1 항균활성

항균활성측정은 paper disk 확산법을 사용하였으며, 사용된 균은 *S. aureus*, *E. coli*, *R. rubra*, *C. albicans*, *S. cerevisia*를 이용하였다.

냉장 보관된 *S. aureus*, *E. coli*, *R. rubra*, *C. albicans*, *S. cerevisia*를 nutrient agar, YM agar, Micrococcus Medium agar배지에 선 도말하여 활성 시켰다. 사용된 세균과 효모는 한국생명공학연구원 유전자은행으로부터 분양 받아서 사용하였다. gram 양성 세균으로 *Staphylococcus aureus*를 gram 음성 세균으로 *Escherichia coli*를 사용하였고, 효모는 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Rhodotorula rubra*를 사용하였으며 그 외 *Candida albicans*도 항균활성 실험에 사용하였다.

활성화된 세균 및 효모의 콜로니를 멸균 증류수에 희석하였다. 희석된 균액 100 μ l를 nutrient agar, YM agar, MM agar배지에 각각 loading한 후, 화염 멸균한 도말봉으로 도말하였다. 6mm paper disk에 희석한 물질 20 μ l (50000ppm)을 loading한 후 clean bench에서 20분간 건조시켜 배지 위에 paper disk간 간격이 3.0cm 정도 되도록 올려 주었다. 이때 control은 MeOH:CH₂Cl₂ 1:1을 사용하였으며, 대조물질로는 Ciprofloxacin 10ppm과 Nystatine 100ppm을 사용하였다. 그리고 incubator (29℃)에서 48시간 배양 후 vernier caliper로 inhibition zone의 크기를 측정하였다 (배지 조성 부록 참조).

3.2 항산화활성 (ORAC assay)

10, 5, 2, 1, 0.5 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ 의 시료, 10mM R-PE 와 50mM AAPH는 반응물로, sodium phosphate buffer는 blank로 사용되었으며, Trolox는 각각의 실험에서 대조군으로 사용되었다. 먼저 R-PE, phosphate buffer 그리고 시료를 37 $^{\circ}\text{C}$ 에 15분간 incubator에서 보관을 하였다. 그리고 AAPH를 첨가하여 반응을 시작하였으며 2분마다 Vitcor3 1420 Multi-label counters Recording Fluorometer (Perkin Elmer)로 형광(emission 590nm, excitation 535nm)을 측정하였으며, 처음 형광값의 5% 보다 적은 수치가 나올 때 까지 반응을 진행시켰다. 반응은 대략 60분 정도 소요 되었으며, blank와 기준물질 그리고 최대 12개의 시료를 분석하였고, 각각의 시료는 3번 반복하여 측정하였다. 그리고 ORAC assay에 대한 값은 아래와 같은 식으로 계산하여 그 결과를 얻었다.³³⁻³⁵⁾

$$\text{Relative ORAC value} = (\text{AUC}_{\text{Sample}} - \text{AUC}_{\text{Blank}}) / (\text{AUC}_{\text{Trolox}} - \text{AUC}_{\text{Blank}}) \times (\text{molarity of Trolox} / \text{molarity of sample})$$

3.3 세포독성

(1) 세포주 및 세포의 배양

본 실험에 사용된 인체 자궁암 세포인 HeLa (Human cervical cancer)와 인체대장암세포인 HM7 (Human colon cancer) 세포주는 ATCC (American Type Culture Collection)사로부터 분양받아 사용하였으며, 세포배양은 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 µg/ml)을 첨가한 DMEM을 배양액으로 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양하였으며, 세포 밀도가 높아지면 수 분 동안 trypsin 처리 (0.05% trypsin, 0.02% EDTA in Hank's balanced salt solution without calcium and magnesium) 하여 세포를 떼어내어 사용하였다. 실험 시 지수기 (logarithmic phase)에 있도록 계대배양 하였고, 모든 실험에는 계대배양 15번 이내의 세포를 사용하였다.

(2) Cell proliferation assay (MTT assay)

시료에 의해 HM7 세포와 HeLa 세포가 받는 세포독성은 MTT assay를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 즉 96 well microtiter tissue culture plate (Falcon)에 HeLa 세포를 2×10^3 cell/well로 plating하고, 시료를 다양한 농도로 처리한 다음 일정시간 동안 5% CO₂, 37°C incubator에서 배양하였다. 이들 세포를 PBS로 수 회 세척하고 MTT (0.5 mg/ml) 용액으로 37°C에서 2시간 반응시키고 상청액을 제거한 다음 DMSO로 녹여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포생존율을 검색하였다.

(3) 면역형광염색

면역형광염색은 Herzog³⁶⁾와 Small의 방법을 병행하여 시행하였다. 즉, chamber slide (Lab-tek)에 HeLa 세포를 5×10^3 cell/well로 plating하여, 24시간 동안 배양한 후 시료를 처리하였다. 매 시간마다 PBS로 2회 세척한 후, 0.25% Triton X-100과 0.5% glutaraldehyde를 포함한 cytoskeleton buffer (10mM MES, 150mM NaCl, 5mM EGTA, 5mM MgCl₂, 5mM glucose)로 실온에서 1분, 1% glutaraldehyde를 포함한 cytoskeleton buffer로 10분 동안 처리 하여 고정시켰다. 이를 다시 PBS로 2회 세척한 후 2% BSA 와 5% horse serum을 포함한 PBS/T (tween-20)로 실온에서 1시간 동안 blocking 한 후, horse serum을 뺀 blocking solution에 tubulin 항체를 첨가하여 12시간 동안 4℃에서 반응시킨 후 PBS/T로 수회 세척한 뒤 Alexa fluor 488 chicken anti-mouse IgG를 첨가하여 상온에서 1시간 동안 반응시켜 면역형광염색을 시행하였다. Nucleus 염색은 0.1% Triton X-100을 포함한 PBS로 실온에서 10분 동안 반응시킨 후, RNase (1mg/ml)와 propidium iodide (0.05 μ g/ml)을 포함한 PBS로 30분 동안 염색하였다. 그 다음 mounting medium을 넣고 coverslip으로 밀봉시켜 confocal microscopy (OlympusTM)로 검경하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 세루로즈 용해성 점액세균의 분리 및 동정

1.1 세루로즈 용해성 점액세균의 분리

국내의 경기도, 경남 일대 중 안산 지역의 배밭, 포도밭, 복숭아밭, 과수원 토양과 김천 지역의 직지사, 직지천 부근과 배밭, 포도밭, 고추밭, 배추밭, 덕천리 나대지 토양을 채집 하였으며, 타 세균 및 곰팡이를 억제하기 위해 1주일간 햇빛이 들지 않는 서늘한 곳에서 충분히 건조시켜 지역별로 분리한 약 3000점의 샘플을 준비하였다.

세루로즈 용해성 점액세균의 분리는 멸균한 종이를 먹이로 한 ST21CX agar배지에 처리하여 15-30일 동안 관찰을 하였다. 그리고 ST21CX agar배지에서 흡 시료 주위에 주로 yellow, orange, black색으로 종이가 용해된 부분을 현미경으로 관찰하였으며 자실체 및 swarm 형태를 확인한 후 분리 하였다. 3-4차례 순화를 통하여 분리된 세루로즈 용해성 점액세균은 KAN 4 agar 배지에서 순화하였으며 접종된 부분에서 자라는 swarm과 자실체의 형태를 통하여 오염 여부를 확인 후 Vy2 배지에 무균적으로 계대 하였다. 분리한 균은 액체 질소에 보관하였다.

이러한 과정을 통하여 총 245점의 점액세균을 분리하였다. 이들 중 세루로즈 용해성 점액세균은 60균주로서 24%를 차지하였다 (Table 1).

Table 1. Myxobacterial strains isolated from soil samples

Taxon	Number of isolated strains
<i>Myxococcus</i> sp.	43
<i>Corallococcus</i> sp.	52
<i>Angiococcus</i> sp.	1
<i>Archangium</i> sp.	49
<i>Cystobacter</i> sp	17
<i>Chondromyces</i> sp.	2
<i>Nannocystis</i> sp.	5
<i>Polyangium</i> sp.	10
<i>Stigmatella</i> sp.	1
<i>Haploangium</i> sp.	-
<i>Melittangium</i> sp.	1
<i>Sorangium</i> sp.	60
Unspecified	4
Total isolated	245

1.2 세루로즈 용해성 점액세균의 동정

점액세균은 아직 많은 연구가 이루어진 상태가 아니다. 분류학적으로 현재 까지 알려진 분류는 12속 35종으로 분류되고 있다.⁴¹⁾

점액세균은 크게 용균성 점액세균과 세루로즈 용해성 점액세균으로 크게 나뉘는데, 용균성 점액세균은 swarm과 자실체의 형태 (Fig. 4) 등의 형태학적 특성을 바탕으로 *Myxococcus*, *Coralloccoccus*, *Angiococcus*, *Archangium*, *Cystobacter*, *Melittangium*, *Stigmatella*, *Polyangium*, *Haploangium*, *Chondromyces*, *Nannocystis*으로 분류되어진다. 이 중 세루로즈 용해성 점액세균은 분류학적으로 모두 *Sorangium cellulosum* 1종에 속하는 것으로 되어 있다.

본 연구에서 분리된 세루로즈 용해성 점액세균은 여과지를 분해하여 영양분

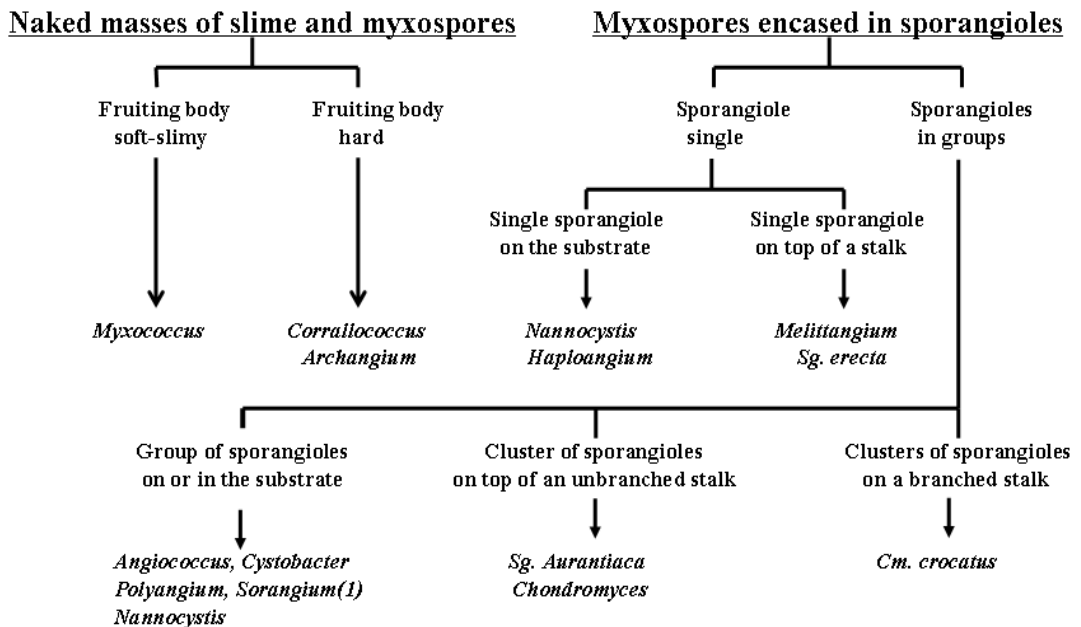


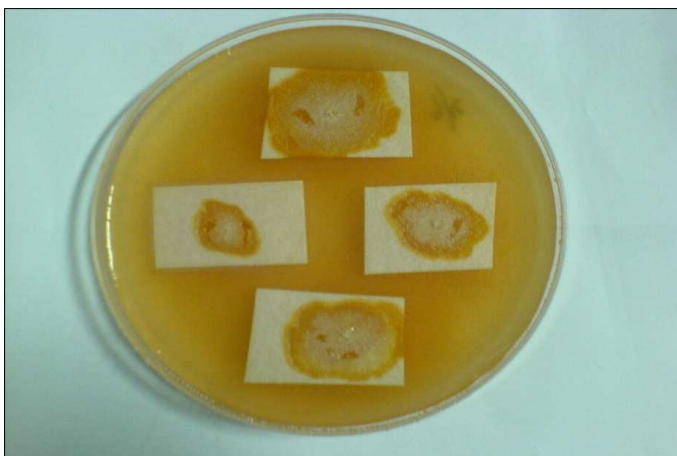
Fig. 4. Key to the fruiting body types of mxobacteria.⁴¹⁾

을 섭취하는 특성을 이용하여 선택적으로 분리 되었고, 고체배지에서 나타나는 자실체와 swarm의 형태를 통하여 세루로즈 용해성 점액세균임을 재확인 할 수 있었다. 또한 분리한 균 중 일부는 한국 미생물 보존 센터에 위탁하여 수행된 16s rRNA의 염기서열 분석한 결과 분류학적으로 *Sorangium cellulosum*에 속하는 것임을 확인 할 수 있었다.

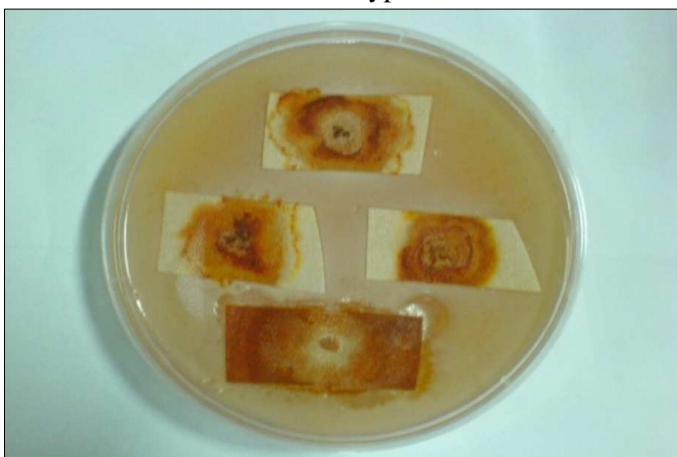
앞서 언급한 바대로 세루로즈 용해성 점액세균은 모두 분류학적으로 한 종에 속하는 것으로 되어 있지만 본 연구에서 분리된 균주들은 형태적으로 서로 많은 차이를 (Fig. 5, 6, 7) 나타내었다. 특히 고체 배지에서의 성장 양상과 균체의 색 및 액체 배양에서 각기 다른 특성을 보였다.

먼저 고체배지 (Vy2)에서는 세 가지의 서로 다른 생장 특성을 보였다. 균체가 배지 위로 둔덕을 형성하는 형태, 배지 아래로 파고드는 형태 그리고 배지 표면에 뿔어나가는 형태를 관찰 할 수 있었다. 자실체 색의 관점에서는 red type, yellow type, black type의 세 가지 형태가 관찰되었으며, 또한 균체의 색이 배양하는 동안 red에서 black으로, 또는 black에서 red로 변하는 균주도 관찰되었다. 액체배양에서도 동일한 변화 양상이 관찰되었으며, 그 중에 균체색이 yellow에서 red나 black으로 변하는 형태와 black에서 red나 yellow로 변하는 형태가 있었다.

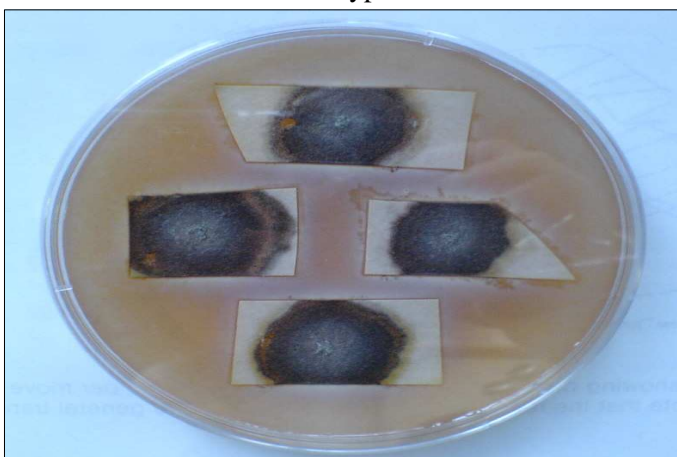
이와 같은 결과로 볼 때 세루로즈 용해성 점액세균은 적어도 세 가지 이상의 다른 종으로 분류되어야 할 것으로 판단된다.



Yellow type

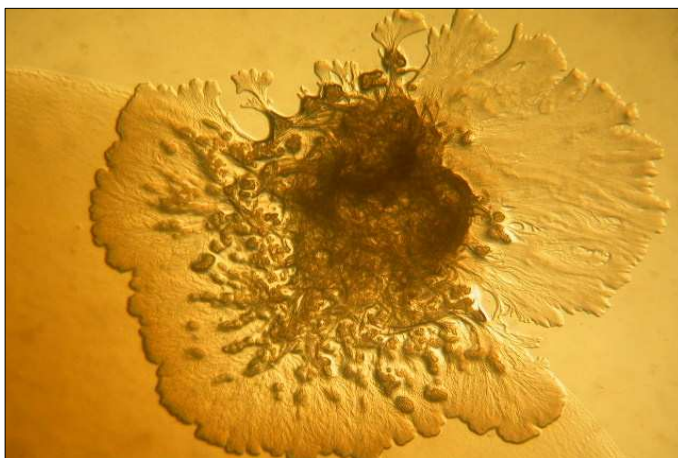


Red type



Black type

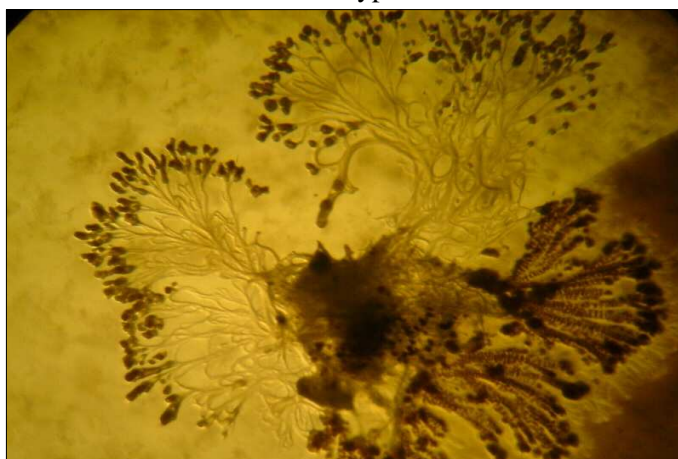
Fig. 5. Swarm colony of *Sorangium cellulosum* on filter paper on ST21CX agar.



Yellow type



Red type

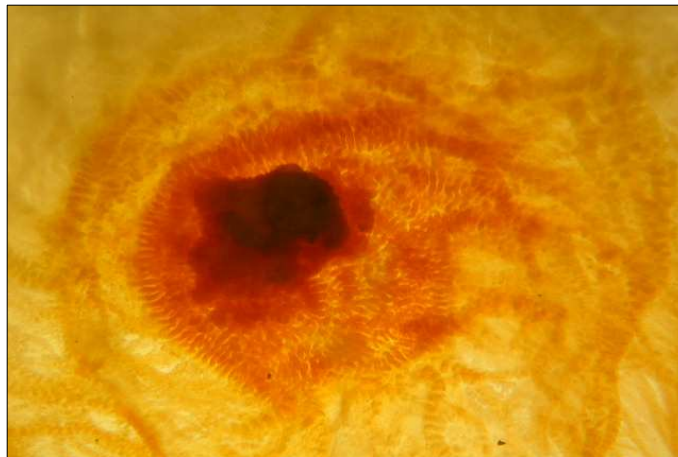


Black type

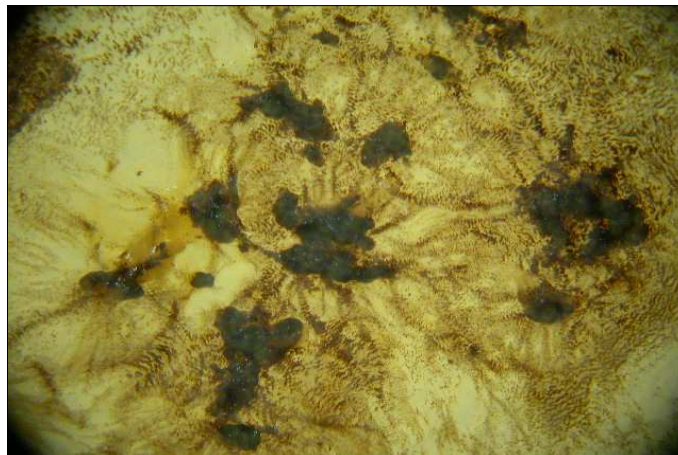
Fig 6. Swarm colony of *Sorangium cellulosum* on KAN 4 agar.



Yellow type



Red type



Black type

Fig 7. Swarm colony of *Sorangium cellulosum* on Vy2 agar.

2. 세루로즈 용해성 점액세균의 대사산물의 스크리닝

토양 샘플에서부터 분리된 총 60균주의 세루로즈 용해성 점액세균에서 38 균주를 배양을 하였다. 얻어진 추출물을 대상으로 TLC 패턴 및 생물활성 등을 통하여 대량 배양이 필요한 균주를 선정 하였는데 (Table 2), 최종적으로 *S. cellulosum* KM1001과 *S. cellulosum* KM1041 두 균주가 선별 되었다.

먼저 *S. cellulosum* KM1001은 경기도 안산 지역의 토양에서 분리한 균으로 black type에 속하였다. 여과지에서 붉은 색의 fruiting body가 검은 색으로 변하는 특성을 관찰 할 수 있었으며, 최종 순화 후 고체배지 (Vy2)에서도 역시 붉은 swarm과 fruiting body의 색을 내며 자라다 일주일 정도 시간이 지나면 fruiting body의 색이 검게 변화하는 것을 볼 수 있었다. 액체배양에서 점액세균의 액체배양 시 관찰되는 flask 벽면에 띠를 형성함과 고체배지에서 나타났던 균체 색이 변하는 배양상의 특성을 가진 균주였다.

S. cellulosum KM1041은 경기도 용인지역에서 분리한 균주로 red type에 속하였다. 여과지와 고체배지 (Vy2)에서 붉은 색의 fruiting body를 형성함을 관찰 할 수 있었다. Swarm은 나뭇가지와 같은 형태로 자랐으며 그 사이에 fruiting body가 형성 되었다. 고체배지에서 특히 다른 균주들 보다 성장 속도가 빨랐으며, 일정기간 동안 고체배양을 하면 배지의 표면을 찢는 특성을 보였다. 액체배양에서도 역시 성장속도가 빨라 많은 균체를 형성하였고 3일간은 노란색의 균체로 성장을 하다 그 이상이 되면 균체의 색이 붉은 색의 균체로 변하는 배양상의 특성을 나타내었다.

Table 2. Screening of myxobacteria for antimicrobial substances

Strain	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibition zone (mm)				
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>R. rubra</i>	<i>S. cerevisia</i>	<i>C. albicans</i>
KM1001	10000	-	-	-	-	7.4
KM1002	10000	-	-	-	-	11.1
KM1003	10000	-	0.6	-	-	-
KM1004	10000	-	8.9	-	-	-
KM1006	10000	0.6	-	-	-	-
KM1007	10000	-	-	-	-	9.1
KM1008	10000	-	-	-	-	11.2
KM1010	50000	9.8	-	-	-	8.75
KM1014	50000	-	-	-	-	14.0
KM1015	40000	-	-	-	-	8.5
KM1016	10000	-	13.6	-	-	-
KM1017	10000	0.6	-	-	-	-
KM1018	10000	-	10.5	-	-	-
KM1019	10000	-	8.6	-	-	-
KM1020	10000	-	0.6	-	-	-
KM1021	50000	-	-	-	-	12.7
KM1022	50000	-	-	-	-	14.9
KM1023	50000	-	0.6	-	-	-

KM1024	10000	-	-	8.8	-	-
KM1025	50000	-	-	-	-	13.4
KM1027	20000	-	0.6	-	-	-
KM1028	40000	15.5	-	0.6	-	-
KM1029	10000	0.6	-	-	-	-
KM1031	10000	-	-	-	-	0.6
KM1032	10000	-	11.9	-	-	-
KM1033	50000	-	12.1	-	-	27.3
KM1034	50000	-	11.2	-	-	-
KM1036	50000	-	0.6	-	-	-
KM1040	50000	0.6	-	-	-	-
KM1041	50000	-	27.2	-	-	-
KM1042	50000	-	-	0.6	-	-
KM1043	50000	-	-	-	-	12.8
KM1044	50000	0.6	-	-	-	-
KM1045	10000	-	0.6	-	-	-
KM1054	10000	-	-	15.9	-	-
KM1059	10000	-	-	0.6	-	-
KM1063	10000	-	14.1	-	-	-
KM1065	10000	-	-	12.0	-	-

이와 같이 *S. cellulosum* KM1001은 black type에 속하며 최종 순화 후 한국 미생물 보존 센터에 기탁하였다. (KCCM 80040). 항균활성에는 활성이 나타나지 않았지만 *S. cellulosum* KM1001의 대사산물에 대한 TLC 결과 다양한 물질이 포함되어 있었으며 그 중에서도 Vanillin-황산 발색시약에 특이한 반응을 나타내는 몇 가지 물질이 발견 되었다. 그리고 *S. cellulosum* KM1041은 red type에 속하며 *E. coli*에 대해 매우 우수한 항균활성을 가지는 것을 볼 수 있었다. 뿐만 아니라 타 균주에 비해 이차대사산물의 생산능도 우수하였다.

3. *S. cellulosum* KM1041의 대사산물의 분리정제, 구조결정 및 생물활성

(1) 배양, 추출 및 분리

경기도 용인토양에서 분리한 균주로 균체색이 붉은 색을 띠는 red type의 형태를 가진 *S. cellulosum* KM1041은 2ℓ 배양 flask를 이용하여 30℃에서 10일간 진탕 (160rpm) 배양하여 총 14.5ℓ의 배양물을 얻었다. Sieving과 원심분리를 통하여 14.5ℓ 액체배양액으로부터 균체와 XAD-16을 분리시켜 이를 acetone으로 추출하였다. Acetone 추출물은 농축을 하여 EtOAc와 H₂O로 분획하였으며, EtOAc 층을 다시 MeOH과 *n*-heptane으로 분획하여 얻은 MeOH 층으로부터 dark brown gum형태의 조추출물 3.6g을 얻었다.

조추출물을 CH₂Cl₂ 100% (fraction 1), CH₂Cl₂-MeOH 9.5:0.5 (fraction 2), CH₂Cl₂-MeOH 9:1 (fraction 3), CH₂Cl₂-MeOH 4:1 (fraction 4)의 용매를 단계적으로 사용하여 silica column chromatography 하였다. 이 중 fraction 2를 RP-18 column chromatography를 통하여 MeOH를 30%부터 10%씩 증가 시키면서 fraction 2.1-2.7까지 7개 fraction으로 나누었다.

Fraction 2.3 (47.6mg)은 *n*-hexane:EtOAc 1:1를 용매계로 하여 silica preparative TLC (UV254nm)를 거쳐 최종적으로 RP-18 semi-prep HPLC (65% aq. MeOH, flow: 4mℓ/min, UV254nm)을 통하여 compound 1을 23mg (2.3mg/ℓ, *t_R*=12min) 순수분리 하였다. Fraction 2.6 (570mg)은 *n*-hexane과 EtOAc를 용매계로 silica column chromatography를 실시하였다. TLC에서 vanillin-황산 발색 시약으로 처리 했을 때 특이한 반응을 나타내는 화합물을 볼 수 있었다. 이 화합물을 포함한 silica preparative TLC (*n*-hexane-EtOAc 1:1, UV254nm)와 RP-18 semi-prep HPLC (85% aq. MeOH, flow: 4mℓ/min, UV207nm)를 행하여 compound 2 (*t_R*=27min)와 3 (*t_R*=38min)을 각각 12.9mg, 10.7mg을 얻었다 (Fig. 8).

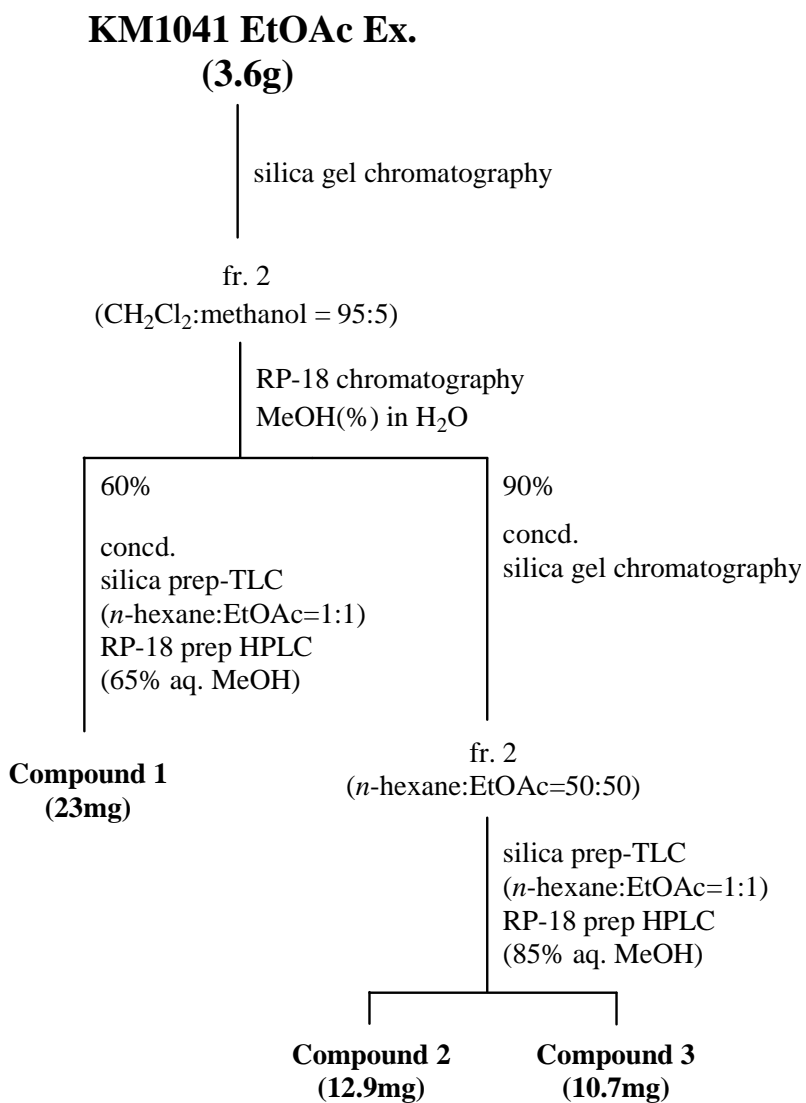


Fig. 8. Isolation of compounds 1-3 from *S. cellulosum* KM1041.

(2) Compound 1의 구조결정

Compound 1은 무색의 결정으로 순수분리 되었다. 이 화합물은 $[\alpha]^{25}_D$ -47.1°(*c* 1.0, MeOH)이었으며 (Table 3), ^1H , ^{13}C NMR과 2D-NMR spectrum을 통하여 구조 분석을 하였다 (Table 4).³⁷⁻⁴⁰⁾

Compound 1의 분자식은 ^{13}C NMR와 HREIMS ($493.2485[\text{M}]^+$, Calcd: 493.2498)를 통하여 $\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{NO}_6\text{S}$ (IHD: 8)로 결정하였다. ^{13}C NMR에서 quaternary carbon이 5개 존재하며 (δ 172.1, δ 54.6, δ 219.8, δ 139.7, δ 166.9) 이 중에서 δ 172.1 (C-1), δ 219.8 (C-5)의 carbon은 carbonyl carbon임을 알 수 있었다. 또한 IR spectrum data에서의 1738cm^{-1} , 1692cm^{-1} 의 peak를 감안하면 δ 172.1 (C-1)의 carbonyl은 ester carbonyl이며 δ 219.8 (C-5)의 carbonyl은 ketonic carbonyl임이 추정되었다.

Table 3. Physico-chemical properties of compound 1

1	
Appearance	Colorless crystal
m.p.	95 °C
Molecular formula	$\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{NO}_6\text{S}$
EI-MS(<i>m/z</i>)	493[M] ⁺
HREI-MS Found	493.2485[M] ⁺
Calcd.	493.2498
UV λ_{max} (MeOH)nm(ϵ)	211(17800), 249(12500)
IR ν_{max} (KBr) cm^{-1}	3476, 1738, 1692
$[\alpha]^{25}_D$ (MeOH)	-47.1°(<i>c</i> 1.0)

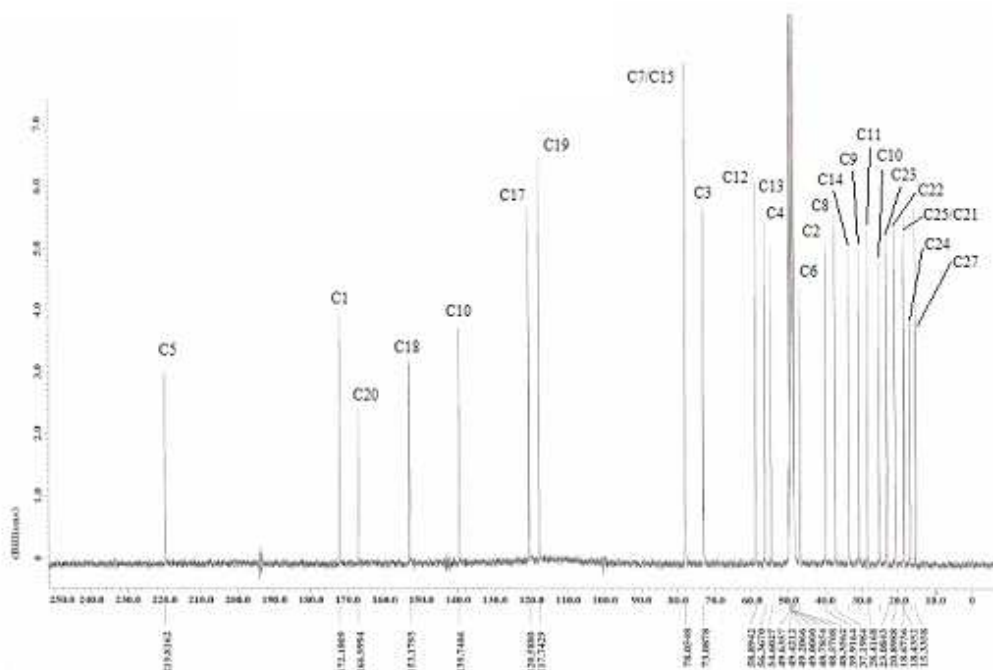


Fig. 9. ^{13}C NMR spectrum of compound 1 in CD_3OD .

$\delta 73.0$ (C-3), $\delta 78.0$ (C-7), $\delta 78.0$ (C-15), $\delta 58.8$ (C-12), $\delta 56.3$ (C-13)의 5개의 oxymethine을 포함하여 9개의 methine이 존재함을 알 수 있었으며, 또한 ^{13}C NMR data에서 5개의 methylene ($\delta 39.9$, $\delta 30.7$, $\delta 25.1$, $\delta 28.4$, $\delta 33.4$)과 5개의 methyl ($\delta 18.6$, $\delta 20.8$, $\delta 23.0$, $\delta 16.8$, $\delta 15.3$)이 존재하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 9).

Compound 1의 부분구조 및 전체적인 평면구조를 ^1H - ^1H COSY, HMBC등과 같은 2D-NMR을 통하여 분석하였다. 먼저 H-15 ($\delta 5.37$)의 proton에서부터 H-6 ($\delta 3.25$)의 proton까지 ^1H - ^1H COSY 실험을 통하여 부분구조를 알았으며, 또한 H-2 ($\delta 2.52$)의 proton과 hydroxyl group을 가지고 있는 carbon (C-3)의 proton이 ($\delta 4.14$) 연결됨을 알 수 있었다. HMBC data에서 H-2 ($\delta 2.52$)의 proton이 C-1 ($\delta 172.1$)의 ester carbonyl의 carbon과 long range coupling

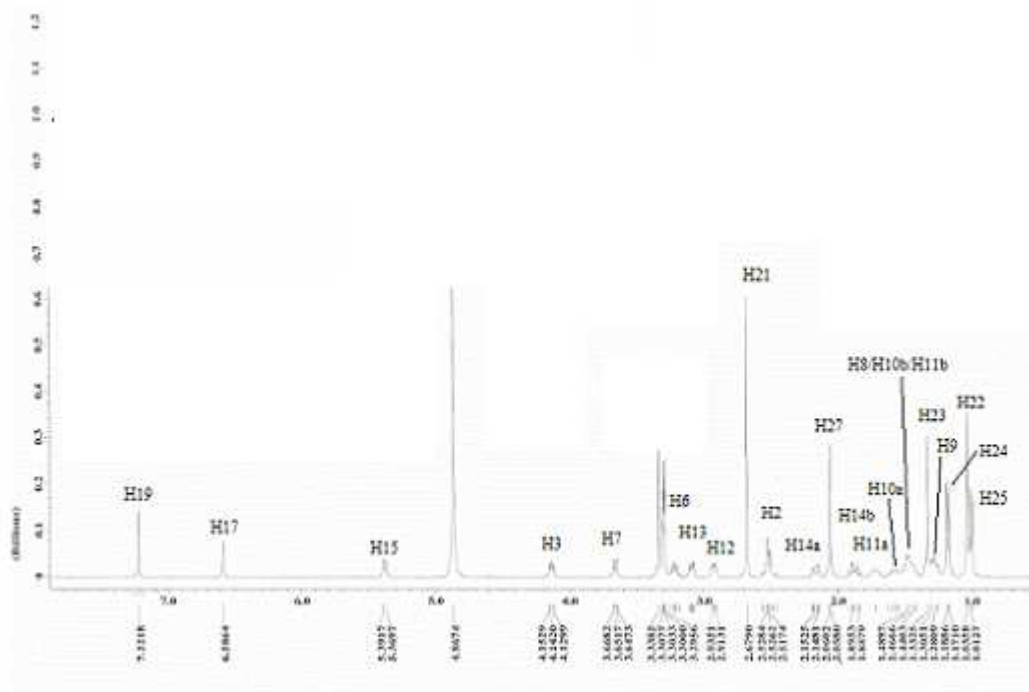


Fig. 10. ^1H NMR spectrum of compound 1 in CD_3OD .

을 하고 있음을 알 수 있었을 뿐만 아니라 이 proton ($\delta 2.52$)의 chemical shift를 통해 ester carbonyl에 의해 down field로 이동한 것으로 보아 H-2와 C-1이 연결된 것임을 알 수 있었다. H-15 ($\delta 5.37$)의 proton과 C-1 ($\delta 172.1$)의 carbon이 long range coupling을 하고 있으며 carbon (C-15)과 proton (H-15)의 chemical shift가 이웃한 곳에 ester carbonyl의 영향으로 인하여 down field로 shift한 것을 또한 알 수 있었다 (Fig. 10). 그리고 H-6 ($\delta 3.25$)의 proton과 C-5 ($\delta 219.8$)의 carbon이 long range coupling을 하고 있었으며 이 methine proton (H-6)의 chemical shift ($\delta 3.25$)가 down field로 이동한 것으로 보아 이웃한 ketonic carbonyl의 영향을 받았음을 알 수 있었다. 두 개의 methyl과 연결된 C-4 ($\delta 54.6$)의 carbon은 H-3 ($\delta 4.14$)과 H-2 ($\delta 2.52$)의 proton과의 coupling을 보여주었다. 또한 H-3 ($\delta 4.14$)과 H-2 ($\delta 2.52$)의 proton은 $\delta 219.8$ (C-5)의 carbon과 long range coupling을 함으로써 lactone ring을 형성하는 것을

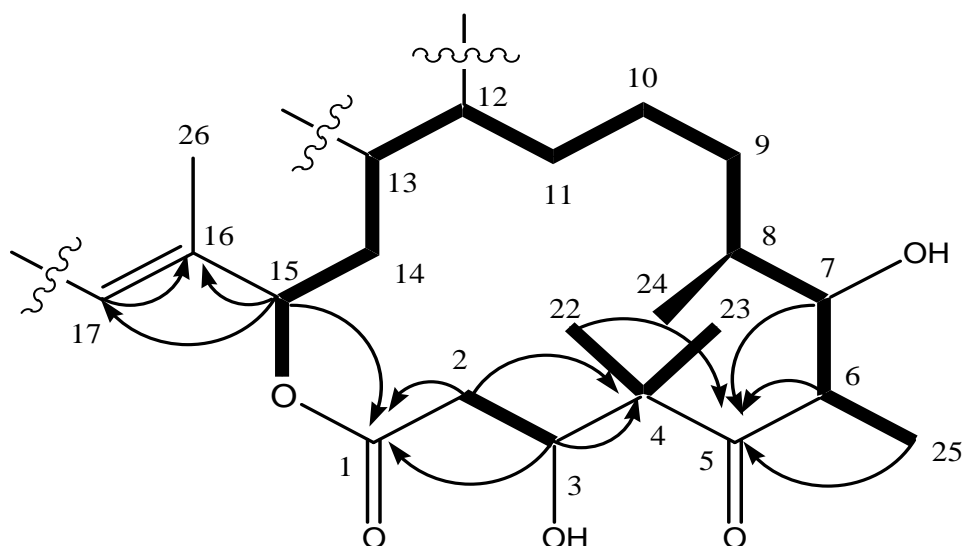
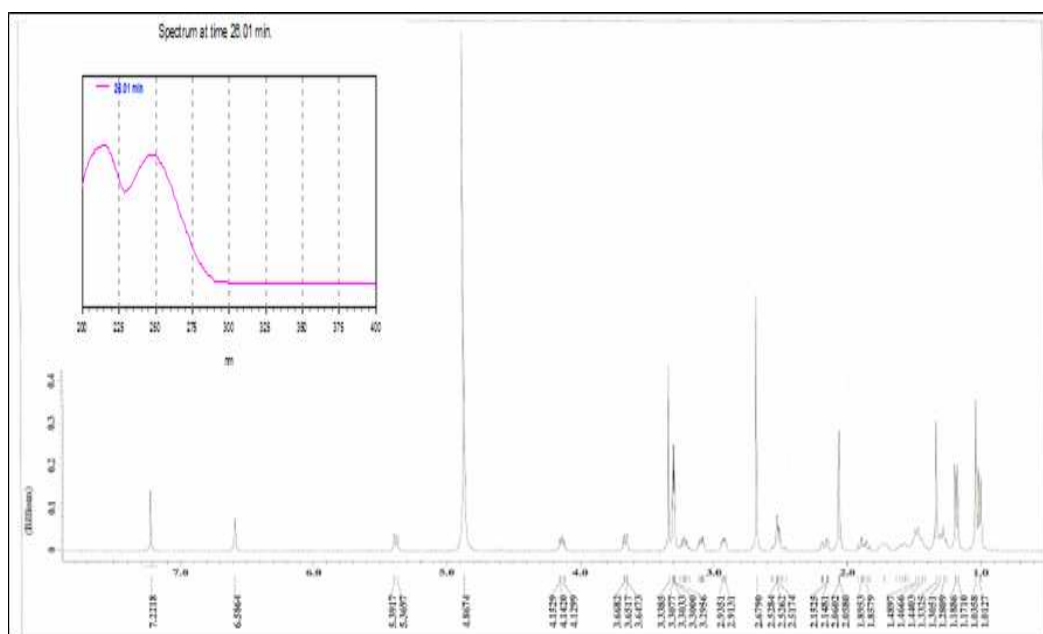


Fig. 11. Partial structure of compound 1. Solid lines indicate ^1H spin systems identified from ^1H - ^1H COSY data, and arrows indicate selected ^1H - ^{13}C long range correlations observed in the HMBC spectrum.

알 수 있다. ^{13}C NMR data에서 sp_2 결합을 하는 C-17 (δ 120.5)의 carbon과 C-16 (δ 139.7)의 carbon이 HMBC로 연결이 되며 또한 H-15 (δ 5.37)의 proton이 C-17 (δ 120.5), C-16 (δ 139.7)의 carbon과 coupling이 됨으로서 그림 13과 같은 부분구조를 알 수 있었다 (Fig. 11).

남아있는 $\text{C}_4\text{H}_4\text{NOS}$ 부분과 4개의 수소모자람지수를 통해 1개의 aromatic ring이 존재함이 시사 되었으며, 또한 H-19의 proton에 chemical shift (δ 7.22)와 coupling 형태 등을 바탕으로 기존 세루로즈 용해성 점액세균의 이차대사 산물에 관한 문헌을 조사한 결과 thiazole ring 혹은 oxazole ring의 존재가 추정되었다.

남은 spectral data와 부분구조를 바탕으로 문헌을 조사한 결과 이 화합물은 이전에 독일의 GBF연구소에 의해 antifungal compound로 분리되어 보고된 바 있는 epothilone A로 UV와 ^1H NMR data가 서로 동일하였다 (Fig. 12).



^1H NMR (400MHz, CD_3OD) and UV spectra of compound 1

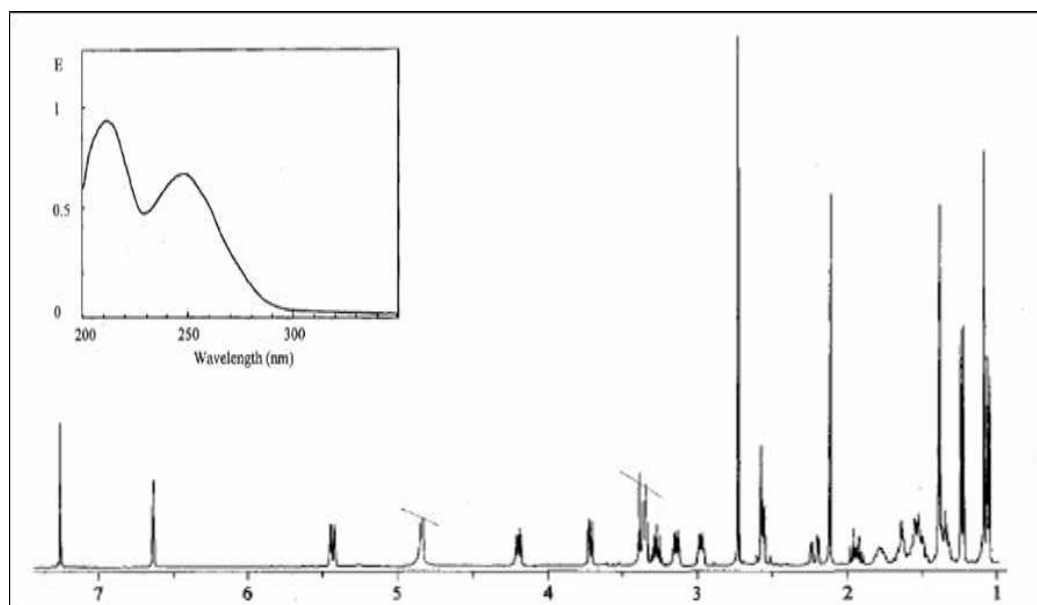


Fig. 12. ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) and UV spectra of epothilone A.¹³⁾

Table 4. ^1H , ^{13}C NMR data and principal HMBC correlations of compound 1

Position	δ_{C}	δ_{H}	HMBC
1	172.1 s		
2	39.9 t	2.52, dd, (14.6, 10.1)	C-1, C-3, C-4
3	73.0 d	4.14, dd, (10.1, 3.8)	C-1, C-2, C-4, C-5, C-22, C-23
4	54.6 s		
5	219.8 s		
6	46.7 d	3.25, dq, (8.4, 6.8)	C-5, C-7, C-8, C-24
7	78.0 d	3.65, dd, (8.4, 1.8)	C-5, C-6, C-8, C-9, C-24, C-25
8	37.1 d	1.48(m)	C-10
9	30.7 t	1.28(m)	C-10, C-25
10a	25.1 t	1.58(m)	C-8, C-25
10b		1.4(m)	
11a	28.4 t	1.72(m)	C-8, C-9
11b		1.4(m)	
12	58.8 d	2.92, dt, (7.5, 1.9)	C-11, C-13
13	56.3 d	3.09, dt, (7.5, 3.5)	C-12, C-14, C-16
14a	33.4 t	2.15, ddd, (12.4, 3.5, 1.8)	C-12, C-13, C-27
14b		1.88, dt, (12.4, 9.1)	C-12, C-13, C-15, C-16, C-27
15	78.0 d	5.37, d, (9.1)	C-13, C-14, C-16, C-17, C-27
16	139.7 s		
17	120.5 d	6.58, s	C-15, C-16, C-19, C-27
18	153.1 s		
19	117.7 d	7.22, s	C-16, C-17, C-20
20	166.9 s		
21	18.6 q	2.67, s	C-18, C-19, C-20
22	20.8 q	1.03, s	C-3, C-4, C-5
23	23.0 q	1.33, s	C-3, C-4, C-5
24	16.8 q	1.18, d, (6.8)	C-5, C-6, C-7
25	18.4 q	1.00, d, (6.6)	C-7, C-8, C-9
26	-	-	-
27	15.3 q	2.05, d, (0.9)	C-15, C-16, C-17, C-18

NMR data were obtained in CD_3OD solution. Assignments were aided by a combination of ^1H - ^1H COSY, HMQC and HMBC experiments. The coupling constants(Hz) are in parentheses.

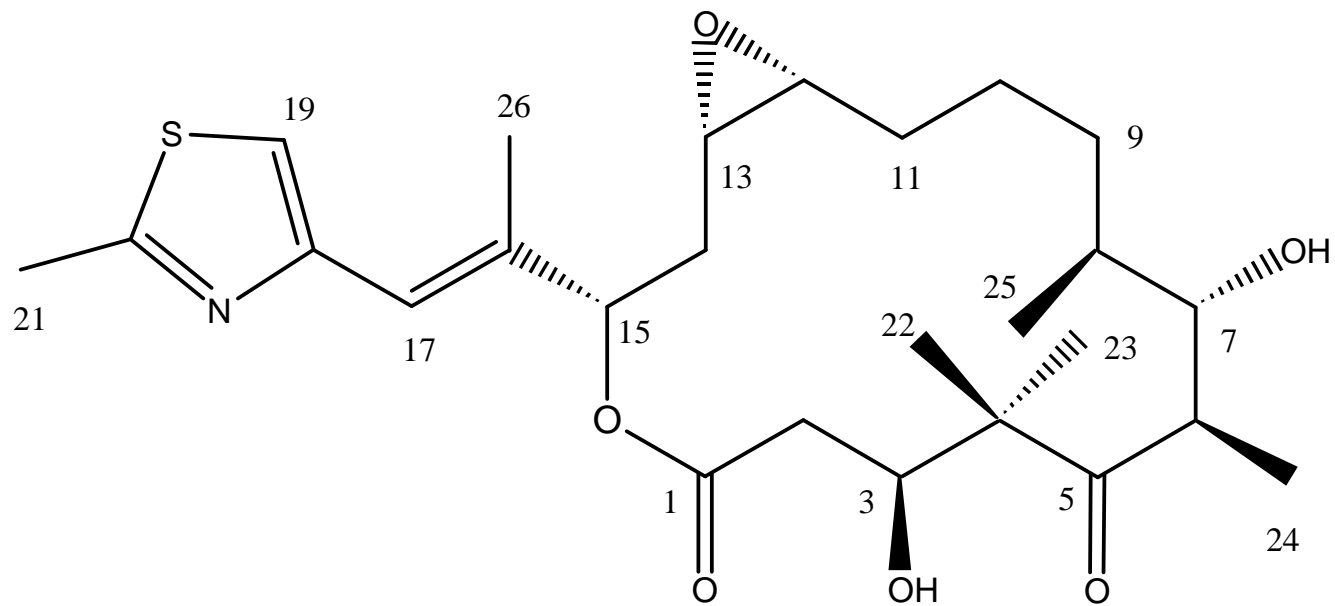


Fig. 13. The structure of epothilone A (1).

(3) Compound 2와 3의 구조결정

Compound 2는 무색의 결정으로 RP-18 semi-prep HPLC (85% aq. MeOH, flow: 4ml/min, UV 207nm)를 통하여 compound 2 ($t_R=27\text{min}$)를 최종적으로 12.9mg을 순수분리 하였다. ^{13}C NMR과 DEPT를 통하여 quaternary carbon (δ 175.6) 하나가 있음을 확인 하였고 이 carbon의 chemical shift로 ester carbonyl인 것을 알 수 있었다 (Fig. 14). Methine은 3개가 있음을 확인할 수 있었으며 (δ 130.9, δ 71.2), methine 중 δ 130.9의 chemical shift를 가지는 두 개의 carbon (C-7', C-8')이 동일한 환경 조건에 의해 겹쳐져 있었다. Methylene은 13개가 있었으며 (δ 35.0, δ 66.6, δ 26.1, δ 30.4, δ 33.2, δ 30.7, δ 30.5, δ 28.2, δ 28.0, δ 30.5, δ 30.4, δ 30.7, δ 23.5), methyl (δ 14.4)은 하나가 존재한다는 것을 spectral data를 통하여 확인 할 수 있었다 (Table 5).

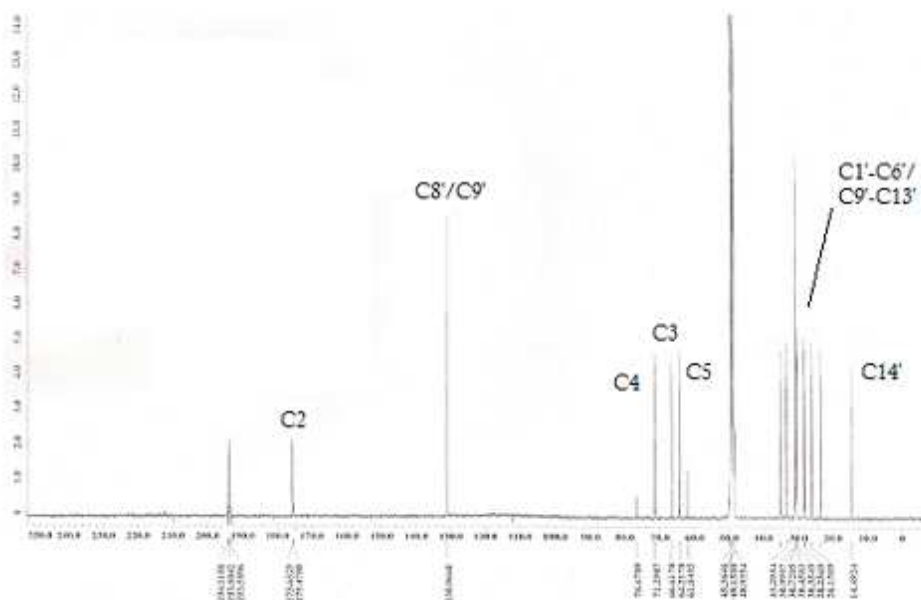


Fig. 14. ^{13}C NMR spectrum of compound 2 in CD_3OD .

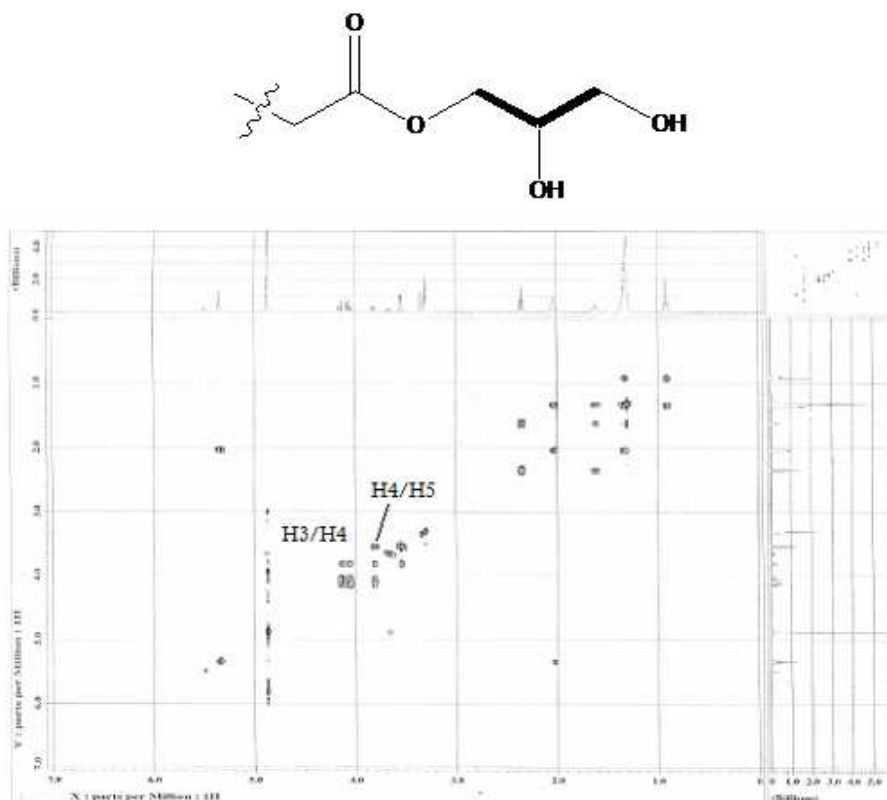


Fig. 16. ^1H - ^1H COSY spectrum of compound 2 in CD_3OD .

(Fig. 16). ^1H - ^1H COSY를 통하여 알아낸 부분구조의 H-3 (δ 4.10)과 C-2 (δ 175.6)사이에 long range coupling을 하는 것으로 보아 ester carbonyl에 연결됨을 알 수 있었다 (Fig. 21). H-1의 proton (δ 2.35)은 down field로 이동한 것과 C-2 (δ 175.6)와 HMBC로 연결이 되는 것으로 보아 ester에 연결이 되어 있음을 알 수 있었다 (Fig. 17).

위의 spectral data를 통하여 glycerol의 부분구조를 결정할 수 있었지만 이와 연결된 aliphatic chain의 구조를 정확하게 증명하는데 한계가 있어 화학적인 방법을 통하여 이들 구조를 결정하였다.

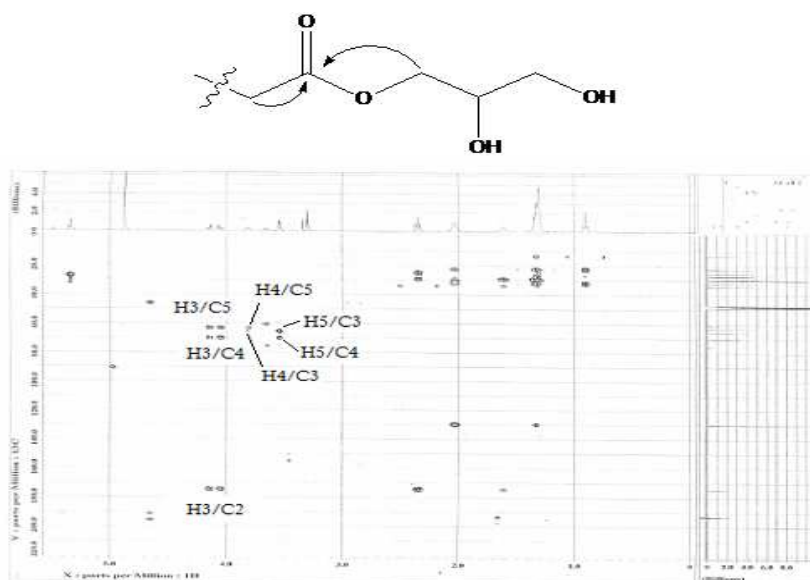


Fig. 17. HMBC spectrum of compound 2 in CD₃OD.

남아 있는 C₁₄H₂₇에 대한 구조를 결정하기 위해 먼저 가수분해 반응을 행하여 그 분해산물에 대해 기기분석을 하였다. ¹³C NMR에서 carbon 중 11개의 methylene carbon이 δ33-23사이에 분포해 있었으며 이들 carbon과 더불어 δ130.9 (C-7', C-8')의 chemical shift를 가진 carbon이 aliphatic chain에 함께 존재함을 알 수 있었다. 분해산물은 대조물질과 유사성을 TLC 및 기기분석을 통하여 비교하였다. 대조물질은 분해산물과 유사한 carbon의 수와 이중결합을 가지고 있는 cis-9-Hexadecenoic acid (palmitoleic acid, SIGMA)를 비교대상 물질로 사용하였다.

Ester 가수분해 실험은 Glycerol1-(9-hexadecenoate) 10mg을 MeOH (1ml)에 용해시킨 용액과 10% NaOH (1ml)를 실온에서 30분간 반응하였다. 반응 종료 후 10% HCl로 중화 시켜 반응물을 농축하였다. 농축물은 다시 H₂O를 넣고 pH3으로 맞춘 다음 에테르로 분획하였다 (20mlx5). 반응물을 함유하고 있는 에테르 부분을 silica chromatography (n-hexane:EtOAc=1:9)로 분리하였으며,

반응물을 6.7mg을 얻을 수 있었다. Standard 물질인 palmitoleic acid는 TLC 및 ^1H NMR spectrum data 통하여 반응물과 비교 하였다.

그 결과 palmitoleic acid와 유사한 R_f 값을 관찰 할 수 있었으며 또한 silica TLC에서 반응 전에 없었던 carboxyl acid에 의한 화합물의 끌림 현상을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 18). ^1H NMR data에서는 전체적으로 동일한 peak를 보였으며, 특히 $\delta 5.49$ 의 proton에 나타나는 chemical shift에서 반응물과 cis-9-Hexadecenoic acid가 같은 chemical shift를 보이는 것으로 동일한 위치에 이중결합이 있다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 19).

이로서 분광적인 data와 화학반응을 통하여 최종적으로 compound 2 (Fig. 20)의 구조를 알았다. 문헌을 조사해 본 결과 이 화합물은 기지 화합

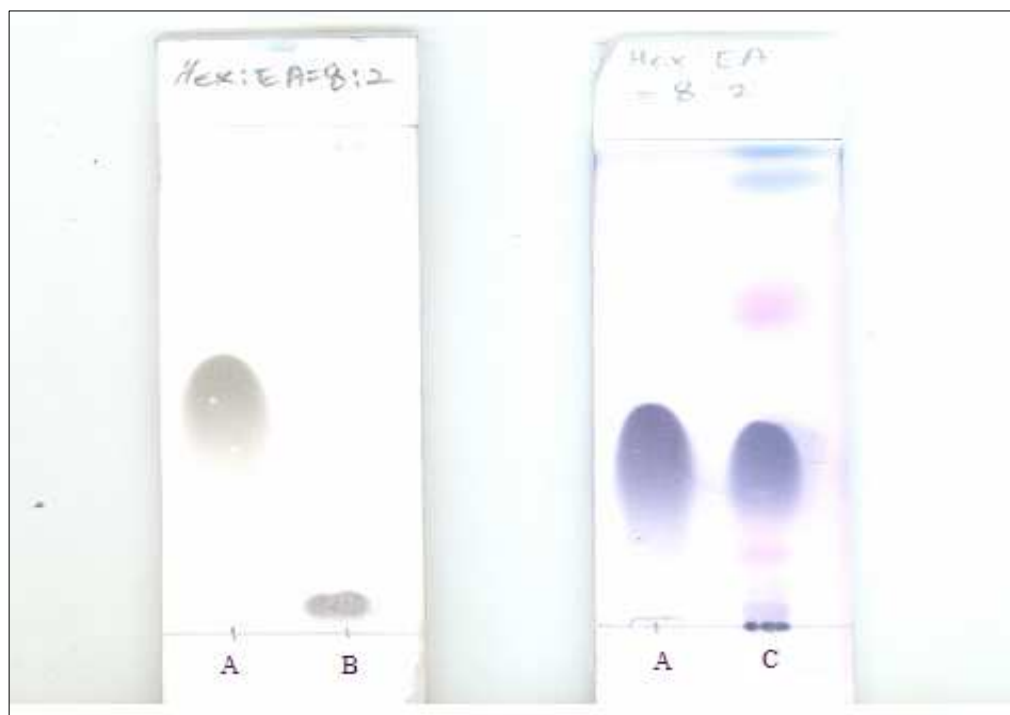


Fig. 18. TLC of the reaction product after alkaline-hydrolysis of compound; A: palmitoleic acid (standard), B: compound 2 before alkaline-hydrolysis C: the reaction mixture after alkaline-hydrolysis.

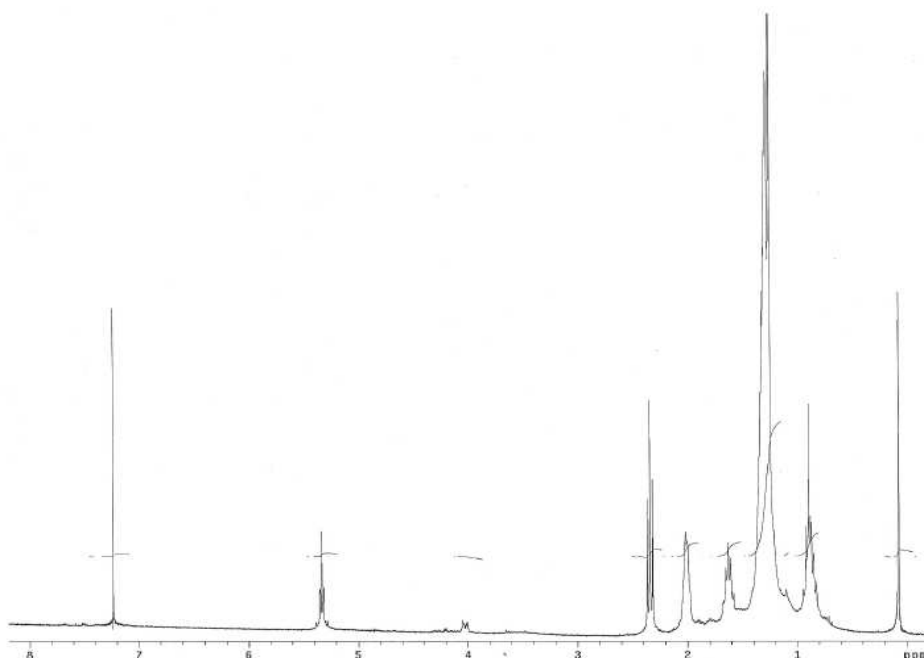


Fig. 19. ^1H NMR spectrum of palmitoleic acid (2).

물로서 올리브 오일의 미량성분임을 알 수 있었다. 결국 compound 2는 Glycerol11-(9- hexadecenoate)임을 확인하였다.

Compound 3 역시 ESI-MS ($353 [\text{M-Na}]^+$)와 EI-MS ($313 [\text{M-OH}]^+$, $239 [\text{M-OCH}_2\text{CHOCH}_2\text{OH}]^+$) 그리고 ^{13}C NMR data를 통하여 $\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{O}_4$ 의 분자식을 알 수 있었다.

^{13}C NMR data에서 $\delta 175.6$ (C-2)에 ester carbonyl과 $\delta 71\text{-}64$ 영역에 hydroxyl group을 가진 carbon 3개가 존재함을 알 수 있었다. Compound 2와 ^1H , ^{13}C NMR을 비교하면 다른 signal은 동일하나 $\delta 130.9$ (C-7', 8')의 carbon과 $\delta 5.34$ (H-7', 8')의 proton이 없는 것을 확인 하였다. 이는 compound 2의 sp^2 결합이 사라지고 sp^3 결합으로 변한 것으로 분자량 또한 compound 2보다 두 분자가 많음이 이를 증명해 주었다.

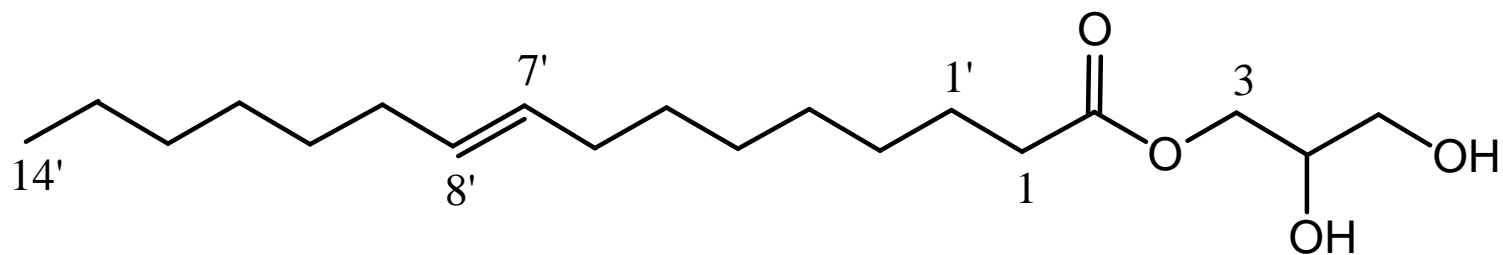
Compound 2와 동일한 방법으로 구조를 결정 하였다. ^1H - ^1H COSY data를 통하여 부분구조를 결정할 수 있었고 H-3 (δ 4.10)의 proton이 C-2 (δ 175.6) ester와 long range coupling을 보임으로써 ^1H - ^1H COSY를 통하여 알 수 있었던 부분구조가 ester와 연결됨을 알 수 있었다. H-1 (δ 2.35)의 proton의 chemical shift가 down field로 이동함과 동시에 C-2 (δ 175.6)와 HMBC에서 coupling 함으로써 ester와 연결됨을 알 수 있었다.

Compound 3 역시 가수분해 반응을 통하여 반응물을 얻었으며, 이 반응생산물의 TLC 및 ^1H NMR을 통하여 대조물질인 palmitic acid와 동일하였다. 이러한 사실을 바탕으로 문헌 조사 결과 compound 3은 palmitin임이 밝혀졌다.

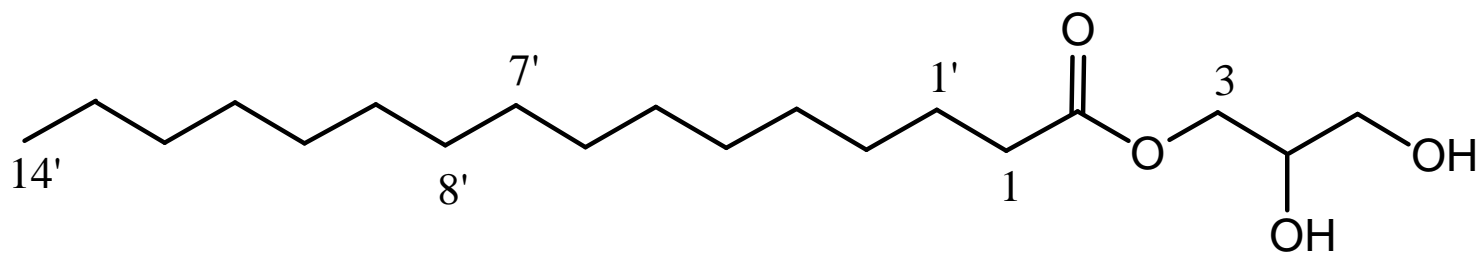
Table 5. ^1H , ^{13}C NMR data and principal HMBC correlations of compound 2

Position	δ_{C}	δ_{H}	HMBC
1	35.0 t	2.35, 2H, t (7.6)	C-2
2	175.6 s		
3	66.6 t	4.10, 2H, ddd (24.6, 13.1, 4.7)	C-2, C-4, C-5
4	71.2 d	3.81, 1H, dq (13.1, 5.5)	C-3, C-5
5	64.2 t	3.55, 2H, dd (5.5, 1.1)	C-3, C-4
1'	26.1 t	1.61, 2H, m	
2'	30.4 t	1.27-1.38, 2H	
3'	33.2 t	1.27-1.38, 2H	
4'	30.7 t	1.27-1.38, 2H	
5'	30.5 t	1.27-1.38, 2H	
6'	28.2 t	2.03, 2H, m	
7'	130.9 d	5.34, 1H, t (5.2)	
8'	130.9 d	5.34, 1H, t (5.2)	
9'	28.0 t	2.03, 2H, m	
10'	30.5 t	1.27-1.38, 2H	
11'	30.4 t	1.27-1.38, 2H	
12'	30.7 t	1.27-1.38, 2H	
13'	23.5 t	1.27-1.38, 2H	
14'	14.4 q	0.91, 3H, t, (7.1)	

NMR data were obtained in CD_3OD solution. Assignments were aided by a combination of ^1H - ^1H COSY, DEPT, HMQC and HMBC experiments. The coupling constants(Hz) are in parentheses.



Compound 2 (Glycerol 1-(9-hexadecenoate))



Compound 3 (Palmitin)

Fig. 20. The structures of compounds 2 and 3.

(4) 생물활성

Epothilone은 현재 phase II의 임상실험이 진행되고 있는 항암활성을 가진 화합물이다. 이는 현재 유방암과 난소암의 치료제로 판매되고 있는 taxol과 동일한 원리로 암세포의 성장을 억제하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서 분리된 epothilone A를 MTT assay와 면역형광염색을 통하여 항암활성을 확인 하였다.

인체자궁암세포인 HeLa cells (Human cervical cancer)과 인체대장암세포인 HM7 cells (Human colon cancer)을 이용하여 epothilone A의 세포독성 실험 및 HeLa cells의 면역형광염색을 하였다. MTT assay 실험을 통한 농도별 암세포 증식 억제 정도를 관찰한 결과, epothilone A는 두 가지 암세포에서 대조군에 비하여 1nM에서는 암세포 증식 억제 효과가 없었으나 HeLa cells의 경우 10nM에서 대조군에 비해 50%의 암세포 증식 억제 효과를 보였고 100nM과 1 μ M에서 각각 28%와 30%의 뛰어난 암세포 증식 억제

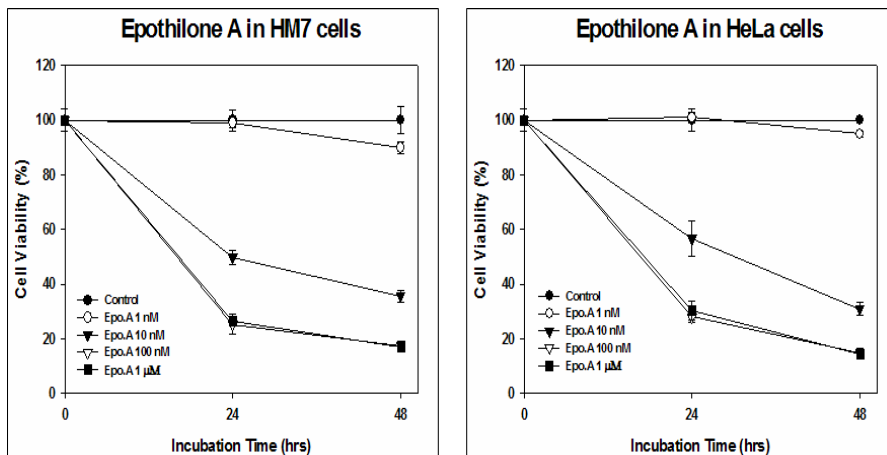


Fig. 21. Cytotoxicity of epothilone A against HM7 and HeLa cells.

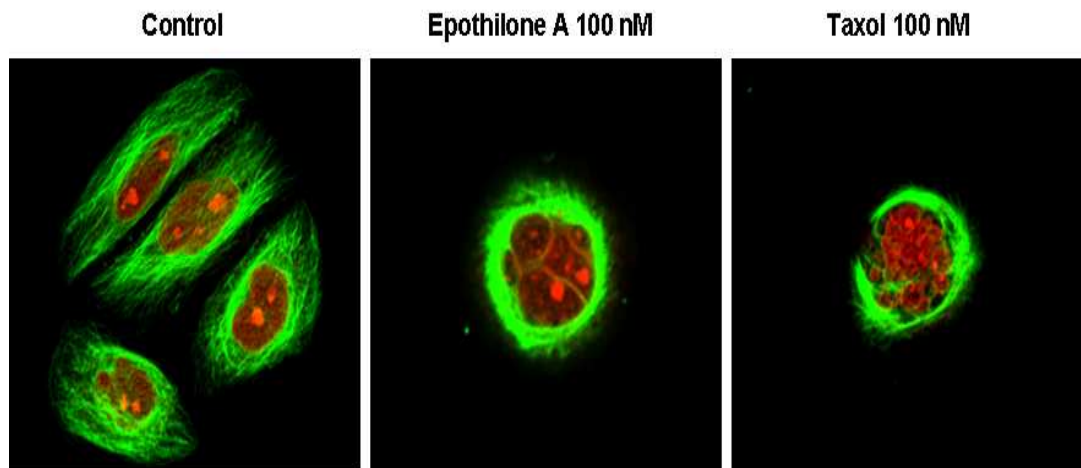


Fig. 22. Microtubule cytoskeleton in the presence of epothilone A and taxol.

효과를 보였다 (IC_{50} 30nM). 또한 HM7 cells에서도 역시 100nM과 1 μ M에서 각각 20% 정도의 뛰어난 암세포 증식 억제 효과를 (IC_{50} 10nM) 관찰 알 수 있었다 (Fig. 21).

Epothilone은 기존 연구에서 taxol과 같은 microtubules를 안정화시킴으로서 활성을 억제 하여 암세포 증식을 억제시키는 물질로 알려져 있다. 위 사진에서 볼 수 있는 것과 같이 정상 암세포 (control)에서는 microtubules이 넓게 퍼져 있어 세포 분열시 핵을 각각의 딸세포로 이동 시킬 수 있으나 epothilone A와 taxol 100nM를 처리한 암세포는 microtubules 안정화됨으로서 활성이 저해 된 것을 볼 수 있었다 (Fig. 22). 이러한 암세포는 분열이 일어나지 않을 뿐만 아니라 스스로 사멸하게 된다.

4. *S. cellulorum* KM1001의 대사산물의 분리정제, 구조결정 및 생물활성

(1) 배양, 추출 및 분리

S. cellulorum KM1001은 경기도 안산지역의 토양 샘플로부터 분리 하였으며, 400ml 배지를 넣은 2ℓ 배양 flask에서 총 10ℓ를 30℃에서 10일간 진탕 (160rpm) 배양하였다. Sieving과 원심분리를 통하여 10ℓ 액체배양액으로부터 균체와 XAD-16을 분리시켜 이를 acetone으로 추출하였다.

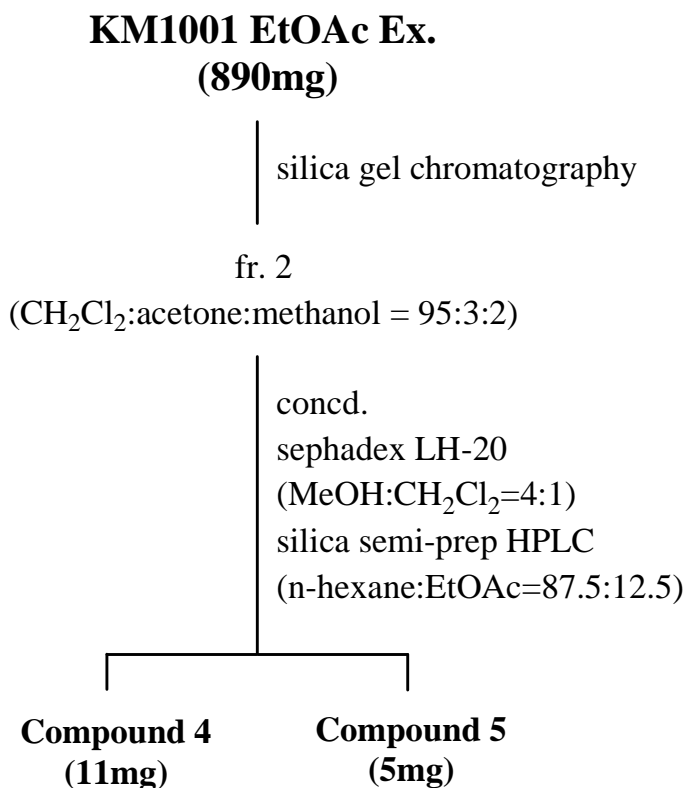


Fig. 23. Isolation of compounds 4 and 5 from *S. cellulorum* KM1001.

Acetone 추출물은 EtOAc와 H₂O로 분획하였으며, EtOAc 부분은 다시 MeOH과 *n*-heptane으로 분획하였다. MeOH 부분은 농축하여 dark brown gum 형태의 조추출물을 890mg 얻었다. 조추출물은 먼저 silica gel column chromatography를 통하여 분리를 하였다. 이때 용매를 CH₂Cl₂-acetone 95:5 (fraction 1), CH₂Cl₂-acetone-MeOH 95:3:2 (fraction 2) 그리고 CH₂Cl₂-MeOH 95:5 (fraction 3)의 용매 순으로 각각 300mℓ씩 용리시켰다. 그 후 fraction 1.2를 MeOH-CH₂Cl₂ 4:1의 용매를 이용하여 sephadex LH-20 최종적으로 silica preparative HPLC (*n*-hexane:EtOAc 87.5:12.5, flow rate: 5mℓ/min, UV: 254nm)를 통하여 compound 4와 5를 각각 11mg (1.1mg/ℓ), 5mg (0.5mg/ℓ)을 순수분리 하였다 (Fig. 23).

(2) Compound 4와 5의 구조결정

Compound 4는 무색의 기름 형태이며 $[\alpha]_D^{25}$ -3.52° (c 0.17, MeOH)의 chiral 화합물 이었다 (Table 6). Compound 4의 구조는 ^1H , ^{13}C NMR과 2D-NMR spectrum을 통하여 결정하였다 (Table 7).

먼저 ^{13}C NMR과 HRFABMS (found: 245.1150[M+Na] $^+$, calcd: 245.1155)을 통하여 이 화합물의 분자식을 $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_3$ (IHD: 5)으로 결정하였다 (Fig. 24).

^{13}C NMR spectrum data에서 quaternary carbon이 3개 (δ 213.2, δ 126.0, δ 157.1) 나타났다. 이 중 δ 213.2 (C-2)의 carbon은 carbonyl carbon으로서 IR spectrum에서 1710cm^{-1} 의 강한 흡수의 peak가 이를 뒷받침 하였다 (Table 7). 또한 δ 126.0 (C-1'), δ 157.1 (C4')의 quaternary carbon과 δ 75.9(C-3), δ 25.7(C-5) δ 131.5 (C-2', C-6'), δ 116.1(C-3', C-5')의 methine이란 것을 알 수 있었다. δ 131.5 (C-2', C-6'), δ 116.1(C-3', C-5')의 carbon은 HMQC실험에 의해

Table 6. Physico-chemical properties of compounds 4 and 5

	4	5
Appearance	Colorless oil	Colorless gum
Molecular formula	$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_3$	$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_3$
ESI-MS	245[M+Na] $^+$	245[M+Na] $^+$
HRFAB-MS Found	245.1150[M+Na] $^+$	245.1154[M+Na] $^+$
Calcd	245.1155	245.1155
UV λ_{max} (MeOH)nm(log ϵ)	203(4.06), 224(3.88), 279(3.61)	201(4.17), 225(3.84), 279(3.24)
IR ν_{max} (KBr) cm^{-1}	3369, 1712	3392, 1710
$[\alpha]_D^{25}$ (MeOH)	-3.52° (c 0.17)	-3.54° (c 0.17)

$\delta 7.00$ (H-2', H-6'), $\delta 6.71$ (H-3', H-5')의 proton과 연결됨을 알 수 있었다 (Fig. 25). 이들 proton의 chemical shift는 방향족 화합물의 proton 영역에 해당하며 각각의 proton은 2H의 적분값을 가지므로 이들과 연결된 두 개의 carbon은 동일한 환경에 위치한 4개의 carbon이 중복되어 나타난 것임을 알 수 있었다. $\delta 75.9$ (C-3)의 carbon은 hydroxyl group을 가지는 methine이 하나 있음 알 수 있었으며, $\delta 44.9$ (C-1)의 methylene 하나와 $\delta 23.9$ (C-6), $\delta 21.8$ (C-7)의 methyl 두 개가 있음을 확인할 수 있었다.

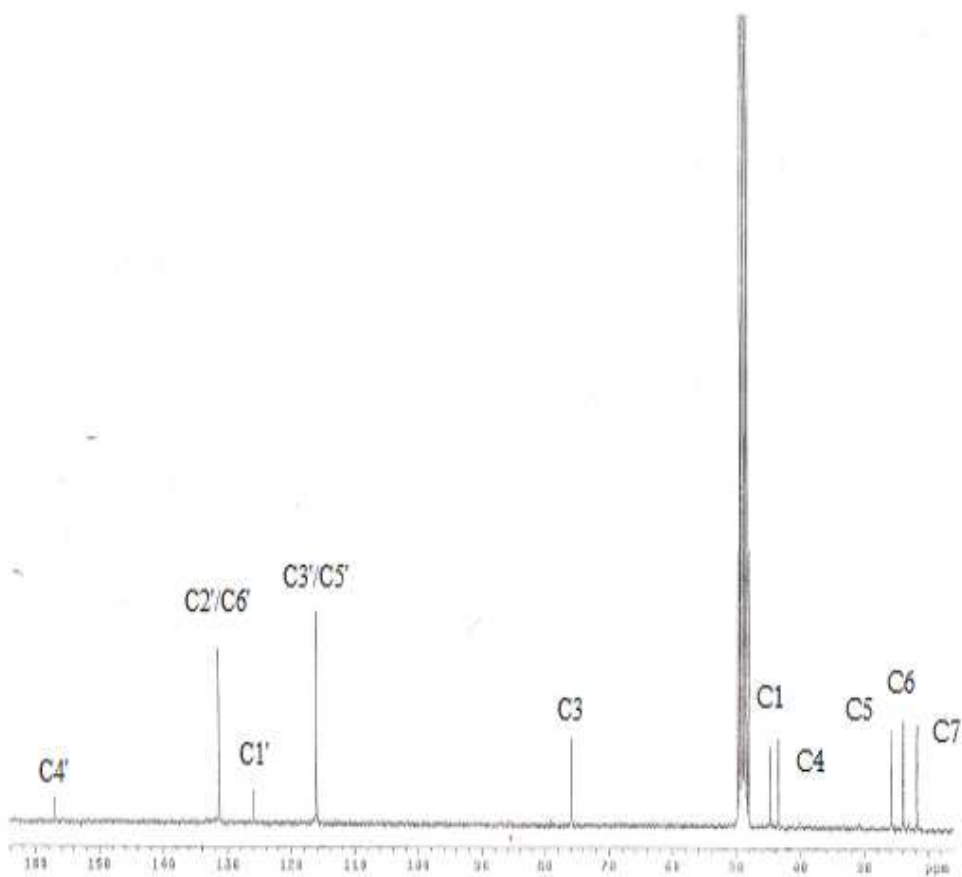


Fig. 24. ^{13}C NMR spectrum of compound 4 in CD_3OD .

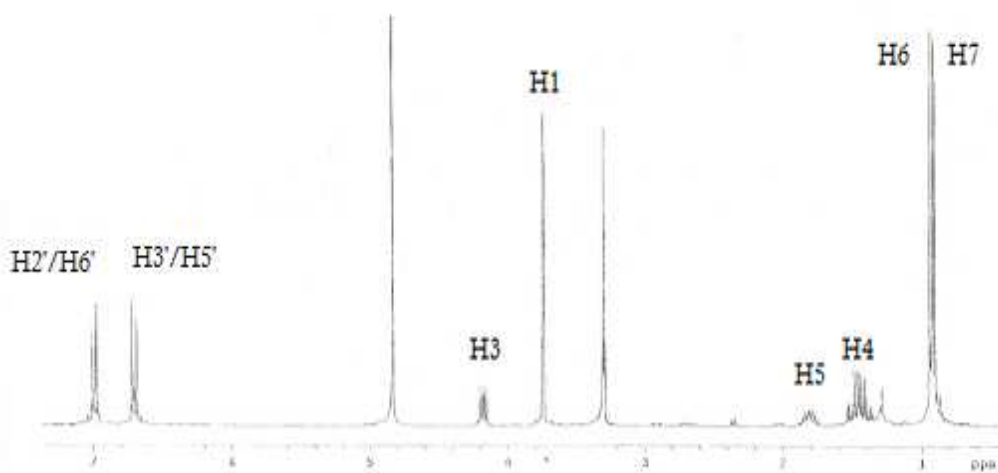


Fig. 25. ^1H NMR spectrum of compound 4 in CD_3OD .

Compound 1의 부분구조 및 전체적인 평면구조는 ^1H - ^1H COSY, gHSQC 그리고 gHMBC와 같은 2D-NMR data를 통하여 결정 하였다 (Table 7). ^{13}C NMR data에서 C-1' (δ 126.0), C4' (δ 157.1), C-2', C-6' (δ 131.5), C-3', C-5' (δ 116.1)의 6개의 carbon 신호와 각각의 carbon에 연결된 proton의 chemical shift가 δ 7.00 ($J=6.7\text{Hz}$), 6.71 ($J=6.7\text{Hz}$)인 것으로 보아 aromatic ring이 존재함을 알 수 있었으며, 이 proton들의 coupling constant값이 6.7Hz인 것으로 보아 이들은 *para* 치환된 형태임을 알 수 있었다. 또한 C-4' (δ 157.1)의 carbon은 C-1' (δ 126.0)의 carbon보다 더 down field로 이동하였다. 이는 hydroxyl group에 의한 것임을 의미하며 IR spectrum data에서 3390cm^{-1} 에서 나타난 강하고 폭이 넓은 흡수의 peak가 이를 뒷받침 하였다.



Fig. 26. ^1H - ^1H COSY spectrum of compound 4 in CD_3OD .

^1H - ^1H COSY 실험에서 H-3 (δ 4.18)과 H-4 (δ 1.45)사이의 coupling함을 확인할 수 있었으며 또한 H-4 (δ 1.45)와 H-5 (δ 1.81), 그리고 H-5 (δ 1.81)와 H-6 (δ 0.93), H-7 (δ 0.92)의 proton들에서 coupling을 관찰할 수 있었다 (Fig. 26).

gHMBC 실험에서는 H-3 (δ 4.18)과 H-4 (δ 1.45)의 proton이 ketonic carbonyl group인 C-2 (δ 213.2)의 carbon과 long range coupling을 보여주었으며, H-1 (δ 3.74)의 proton이 C-2 (δ 213.2)와 long range coupling로 연결됨을 알 수 있었다. 또한 H-1 (δ 3.74)의 chemical shift는 일반적인 methine의 chemical shift 보다 더 down field로 이동 하였는데 이는 주위에 carbonyl group이 존재함을 시사하는 것이다. 따라서 위와 같은 spectral data를 통하여 3-hydroxy-2-butanone과 *iso*-propyl group의 부분구조가 존재한다는 것을 알 수 있었다.

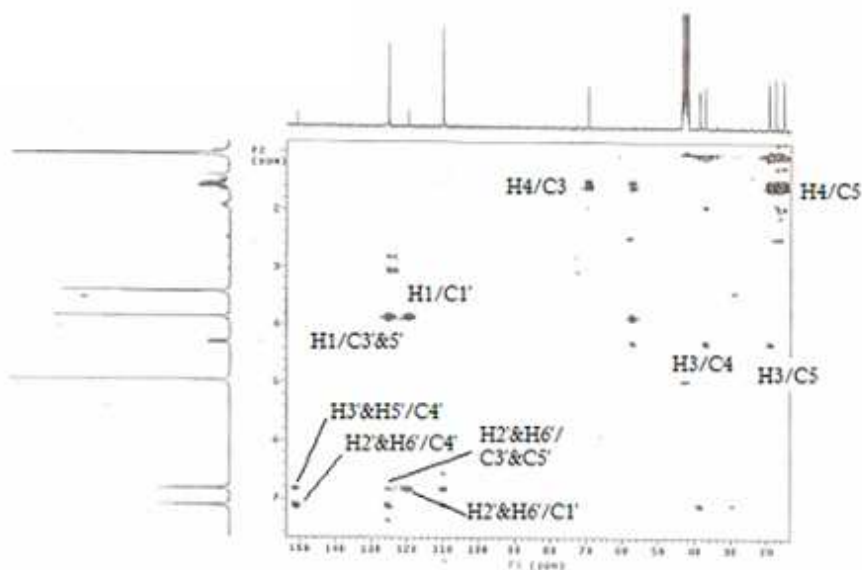


Fig. 27. gHMBC spectrum of compound 4 in CD₃OD.

H-1 (δ 3.74)의 proton은 C-2', C-6' (δ 131.5)의 carbon과 long range coupling을 보임으로서 3-hydroxy-2-butanone의 부분구조는 aromatic ring과 연결되었음을 알 수 있으며 이 methylene proton의 chemical shift가 carbonyl group에 의해 down field로 이동하는 것 보다 더 down field로 이동 되어 있는 것을 보아 δ 3.74의 proton (H-1)이 aromatic ring과 carbonyl group 사이에 위치해 있음을 알 수 있었다 (Fig. 27). 이를 통하여 최종적으로 compound 4의 구조를 3-hydroxyl-1-(4-hydroxyphenyl)-5-methylhexan-2-one (Soraphinol C)으로 결정하였다.

문헌 조사결과 이 화합물은 new compound 임을 알 수 있었고, 이를 soraphinol C라고 명명하였다. 이 화합물의 absolute stereochemistry를 결정하기 위해 현재 유기합성을 진행 중 이다.

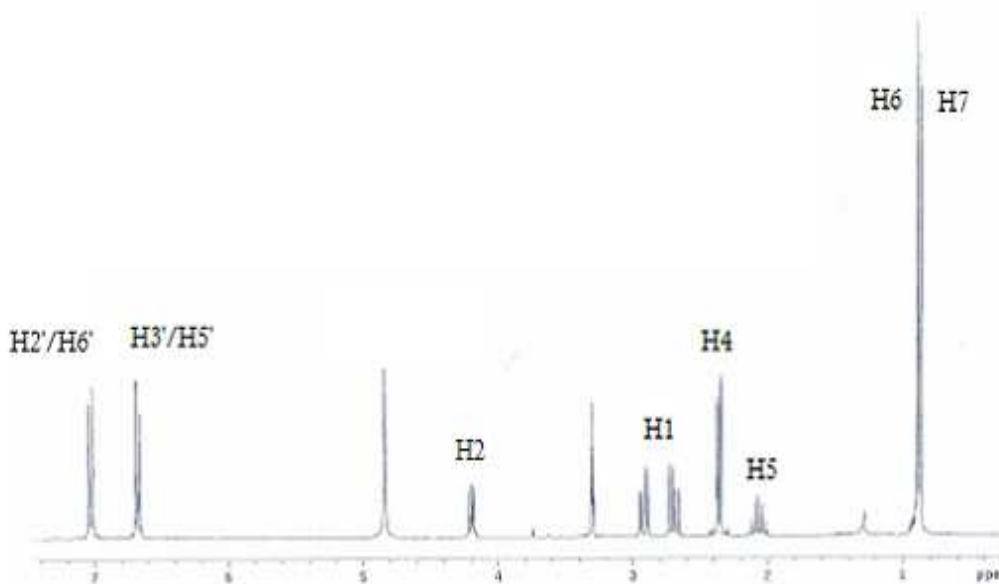


Fig. 28. ^1H NMR spectrum of compound 5 in CD_3OD .

Compound 5는 ^{13}C NMR data와 HRFABMS (found: $245.1150[\text{M}+\text{Na}]^+$, calcd: 245.1155)을 통하여 $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_3$ (IHD:5)의 분자식을 가짐을 알 수 있었으며, compound 4와 동일한 방법으로 구조를 결정하였다.

Spectral data를 통하여 이치환 aromatic ring, 3-hydroxy-2-butanone 및 *iso*-propyl group의 부분구조를 알 수 있었다. gHMBC의 실험을 통해 H-1 (δ 2.91/ δ 2.69)의 proton은 C-2', C-6' (δ 131.3)의 carbon과 long range coupling을 함으로서 compound 4와 달리 hydroxyl group 옆의 methylene이 aromatic ring과 연결이 된 것을 알 수 있었다. ^1H NMR data에서 compound 4와 비교 해 볼 때, compound 4의 H-1 (δ 3.74)의 proton은 carbonyl group에 의해 chemical shift가 down field로 이동 하였으며, spin-spin splitting이 singlet인 것을 알 수 있지만 compound 5의 H-1 (δ 2.91/ δ 2.69)의 proton은 hydroxyl group이 위치함에 따라 chemical shift가 up field로 이동한 것을 볼 수 있으며 또한 spin-spin

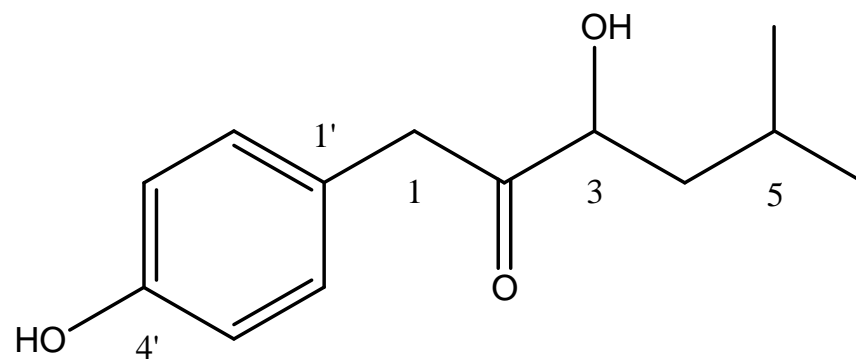
splitting이 double-doublet으로 갈라진 차이점을 확인 하였다. 그리고 H-5의 proton 역시 chemical shift와 spin-spin splitting에서 차이점을 관찰 할 수 있다. 이를 통하여 compound 5는 compound 4와 비교하여 carbonyl group과 hydroxyl group의 위치가 바뀐 isomer 형태인 것을 확인 하였다 (Fig 28).

문헌을 조사해 본 결과 compound 5는 4-hydroxylsattabacin인 것을 알 수 있었다. 이 화합물은 이탈리아의 연구진에 의해 *Bacillus* sp.에서 분리된 바 있는 기지화합물임을 확인 하였다.¹⁷⁾

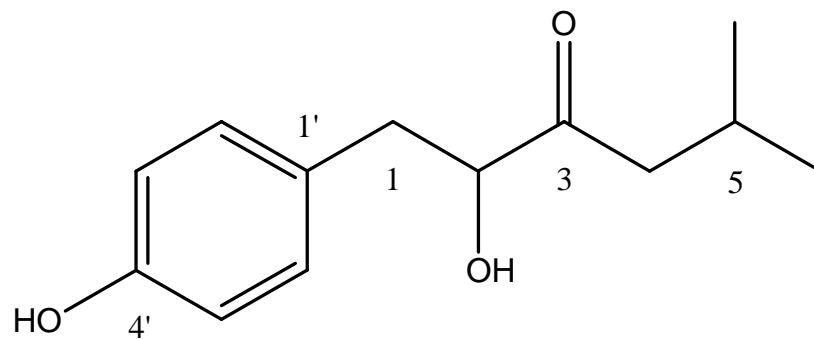
Table 7. ^1H , ^{13}C NMR data and principal gHMBC correlations of compound 4

Position	δ_{C}	δ_{H}	HMBC
1	44.9 t	3.74, 2H, s	C-2, C-2', C-6'
2	213.2 s		
3	75.9 d	4.18, 1H, dd(9.6, 4.2)	C-2, C-4, C-5
4	43.5 t	1.45, 2H, m	C-2, C-3, C-5
5	25.7 d	1.81, 1H, sept(6.6)	
6	23.9 q	0.93, 3H, d (6.6)	
7	21.8 q	0.92, 3H, d (6.6)	
1'	126.0 s		
2'(6')	131.5 d	7.00, 2H, d (6.7)	C-1, C-3', C-4', C-5'
3'(5')	116.1 d	6.71, 2H, d (6.7)	C-1', C-4'
4'	157.1 s		

NMR data were obtained in CD_3OD solution. Assignments were aided by a combination of ^1H - ^1H COSY, gHMQC and gHMBC experiments. The coupling constants(Hz) are in parentheses.



Compound 4 (Soraphinol C)



Compound 5 (4-hydroxylsattabacin)

Fig. 29. The structures of compounds 4 and 5.

(4) 생물활성

Antioxidant activity를 측정하기 위하여 oxygen radical absorbance capacity (ORAC) method를 사용하였다. 이 방법은 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride에 의해 발생하는 peroxy radical의 소거 활성을 관찰하는 것이다. 이 실험 통하여 soraphinol C의 항산화 활성은 대조물질로 사용한 trolox (a water-soluble derivative of vitamin E)와 비교했을 때 이것과 유사한 활성을 보였다 (0.956 ORAC). 하지만 isomer인 4-hydroxylsattabacin은 이에 비해 낮은 활성 (0.617 ORAC)을 보여 이 두 화합물의 구조적 차이가 hydroxyl group과 keto-carbonyl group의 위치변화에 따른 활성의 변화를 알 수 있었다 (Table 8).

Table 8. Antioxidant activities of the soraphinol C and 4-hydroxylsattabacin

Compounds	ORAC _{PE}
Soraphinol C	0.956 ± 0.10
4-hydroxylsattabacin	0.617 ± 0.09

^aORAC values are expressed as relative Trolox equivalent calculated based on eq 2.

Data are expressed as the mean values ± the standard deviations(n=3)

IV. 결 론

점액세균은 절대 호기성의 토양 박테리아로서 세균과 진균의 특징을 모두가진 미생물로 gram negative의 활주 운동을 하는 세균 (gliding bacteria)이다. 점액 세균은 크게 용균성 점액세균과 세루로즈 용해성 점액세균으로 구별되며 일반 미생물이나 통상 세균 분리법으로 자연계에서 분리가 불가능하고 배양이 까다롭다. 세루로즈 용해성 점액세균이 생산하는 95%가 antibiotic compound를 가지며 현재 epothilone의 생산균으로서 주목받고 있다.

현재까지 미생물 중 가장 분리 및 배양이 가장 까다롭다고 알려진 점액세균을 국내에서 처음으로 분리 및 배양에 성공하였으며, 또한 대량배양을 통한 이차대사산물을 분리하여 여러 가지의 생물활성물질을 분리하였으며 특히 epothilone A와 그 유도체들을 생산하는 균을 분리하였다는 점에서 큰 의의가 있다.

이러한 세루로즈 용해성 점액세균의 분리 및 배양 그리고 화합물의 분리 기술을 토대로 본 실험에서는 경기도 지역과 경남 지역의 국내 토양 시료로부터 점액세균을 250여 종을 분리하였고 이 중 60 종의 세루로즈 용해성 점액세균을 분리 및 순화하는데 성공하였다. 균의 분리 과정에서 지금까지 *Sorangium cellulosm* 단 한 종만이 있다고 보고되었지만 분리된 균주의 고체 배지에서 배지 위로 둔덕을 형성하거나 배지를 파고들고 표면에 뿔어나가는 등 다양한 형태를 보였으며, 균체색은 red type, yellow type, black type이 관찰되었다. 또한 액체배양에서는 균체색이 yellow에서 red나 black으로 변하는 type과 black에서 red나 yellow로 변하는 type도 있었다. 이러한 다양한 형태 학상 특성을 지니고 있는 세루로즈 용해성 점액세균을 분류학적으로 *Sorangium cellulosum*만 인정되고 있어 적어도 세 가지의 type으로 관찰됨에

따라 이에 대한 연구는 더 이루어져야 될 것으로 사료된다.

분리한 60개의 균주 중 38균주를 예비 배양하여 그 대사산물을 분리하였으며 이를 여러 가지 생물활성실험에 사용하였다. 이중 TLC에서 특이한 형태를 보이거나 생물활성실험에서 뛰어난 활성을 보이는 KM1001과 KM1041을 선별을 하였고 이 두 균주는 대량배양을 통하여 대사산물을 얻었으며, 이를 통하여 4개의 화합물을 분리 할 수 있었다. 화합물은 ^1H , ^{13}C NMR, ^1H - ^1H COSY, HMQC, HMBC와 MASS spectrum을 통하여 구조를 분석 하였으며 신규물질 1개와 기지물질 3개를 분리를 하였다. KM1001에서 분리한 soraphinol C는 항산화 실험에서 대조물질로 사용한 trolox에 비교할 만한 활성 (0.956 ORAC)을 보였으며, 균주 KM1041로 부터는 epothilone A와 새로운 구조로 추정되는 유도체를 분리하였다. Epothilone A는 암세포 증식 억제 실험에서 뛰어난 활성을 보였으며, 면역형광염색실험을 통하여 기존 연구에서 밝혀진 microtubules를 안정화시킴으로서 암세포를 저해함을 관찰하였다.

이상의 결과로부터 세루로즈 용해성 점액세균은 우수한 생물활성을 가진 대사산물의 생산자임을 재확인 되었다.

부 록

1. 시약 및 기기

◎ 시약 및 충전제

Agar, EP (Junsei)

Baker's Yeast, CP (BRUGGEMAN)

Beef Extract, EP (DIFCO)

$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, GR (Junsei)

Casitone EP (DIFCO)

Congo-red EP (Sigma)

Ciprofloxacin (한국화학연구원으로부터 분양)

Cyanocobalamine, EP (Sigma)

Cycloheximide, EP (ACROS)

Dextrose, EP (YAKURI)

Dimethylsulfoxide, GR (Junsei)

HEPES, EP (J.T.BAKER)

LiChroprep RP-18 (40-63 μm , MERCK)

Malt Extract, EP (DIFCO)

$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, GR (Junsei)

Peptone, EP (MERCK)

Sephadex LH-20 (bead size 25~100 μm , Fluka)

Silica gel 60 (0.040-0.063mm, 230-400 mesh ASTM, MERCK)

TLC plate /silica gel F254, 20×20cm, 0.25mm (MERCK)

TLC plate /RP-18 gel F254, 20×20cm, 0.25mm (MERCK)

Tryptone, EP (DIFCO)

Vanilin (Fluka)

XAD-16, mesh 20.00~60.00 (Rohm & Haas)

Yeast Extract, EP (DIFCO)

◎ 용매

Acetone (Extra Pure, DUCSAN)

Buthyl Alcohol (Extra Pure, DUCSAN)

Ethyl Acetate (Extra Pure, DUCSAN)

n-Heptane (Extra Pure, DUCSAN)

Hexane (Extra Pure, DUCSAN)

Isopropyl Alcohol (Extra Pure, DUCSAN)

Methyl Alcohol (Extra Pure, DUCSAN)

Methylene Chloride (Extra Pure, DUCSAN)

Tetrahydrofuran (Extra Pure, DUCSAN)

◎ 기기

배양 관련 기기

Autoclave (SJ-220A45, SEJONG)

B.O.D incubator (SJ-250B, SEJONG)

Clean bench (SJ-701S2, SEJONG)

Electronic balance (SHIMADZU BL220H, SHIMADZU)

pH meter (Orion 420A, Orion)

Rotavapor (BUCHI R-200, BUCHI)

Shaking incubator (SJ-808M2, DONGWON/SEJONG)

Shaking waterbath (circulator, Mono-TECH ENG CO MSB-1511D)

Vacuum pump (ULVAC G-50SA)

UV/Visible spectrophotometer (CM-10 Spectroline, MODEL ENF-240C)

해부현미경 (OLYMPUS SZ11)

진공 고속 원심분리기 (Supra22K, Hanil)

분석관련기기 및 칼럼

Sephadex LH-20 (Universail system)

Fraction collector (Pharmacia Biotech)

Detector (254nm, 2238UVICORD S II, LKB BROMMA)

Recorder (Pharmacia Biotech)

MPLC (YFLC-5404, Yamazen)

UV-detector (Prep. UV-10V)

column: LiChroprep Si 60 (240x10mm, 40-63 μ m, MERCK)

LiChroprep RP-18 (240x10mm, 40-63 μ m, MERCK)

HPLC

Detector (Diode array detector, SPD-M10Avp, SHIMADZU)

Pump (LC-6AD, SHIMADZU)

Degasser (DGV-14A, SHIMADZU)

Program (CLASS-VP ver.6.14 sp1)

Analytical column

CAPCELL PAK C18 (UG120, 5 μ m; 4.6mmI.D.x250mm, SHISEIDO)

YMC-Pack SIL (5 μ m, 12nm; 4.6mmI.D.x250mm)

YMC-Pack Diol -120-NP (5 μ m, 12nm; 4.6mmI.D.x150mm)

Preparative column

CAPCELL PAK C18 (UG120 Å, 5 μ m; 10mmI.D.x250mm, SHISEIDO)

YMC-Pack SIL (5 μ m, 6nm; 10mmI.D.x250mm)

YMC-Pack Diol -120-NP (5 μ m, 12nm; 20mmI.D.x150mm)

분광학 기기

Varian UNITY 500 spectrometer (^1H :500MHz, ^{13}C :125MHz)

JNM ECP-400 spectrometer (^1H :400MHz, ^{13}C :100MHz).

Optical rotation (JASCO P-1020 polarimeter)

UV spectrum (Agilent 8453 spectrophotometer)

◎ 시험균

Escherichia coli (KCTC 12006)

Saccharomyces cerevisiae (KCTC 7246)

Staphylococcus aureus (KCTC 1916)

Rhodotorula rubra (KCTC 1209)

Candida albicans (KCTC 7965)

◎ 배지 조성

ST21CX agar 배지

Solution A: K_2HPO_4 1%, Yeast extract 0.02%, Agar 12%;

Solution B: KNO_3 1%, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, Cycloheximide 50mg/ℓ, TES 1ml/ℓ

KAN 4 agar 배지

$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 1%, Agar 15%, Cycloheximide 50mg/ℓ, Kanamycin 250mg/ℓ, pH7.2

Vy2 agar 배지

Baker's yeast 0.5%, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, Agar 1.5%, Cyanocobalamin 0.5mg/ℓ, pH 7.2

Sorangium cellulosum 액체 배지

HEPES 50mM, Potato starch 0.8%, Soyameal 0.2%, Glucose 0.2%, XAD-16

6g, Yeast extract 0.2%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%,
Fe-EDTA 0.0008%, TES 1ml/ℓ, pH 7.3~7.4

CAS 배지

Casitone 1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%

Nutrient agar (NA) 배지

Tryptone 1%, Yeast extract 0.5%, NaCl 1%, Glucose 0.1%, Agar 1.5%, pH 7.2

YM 배지

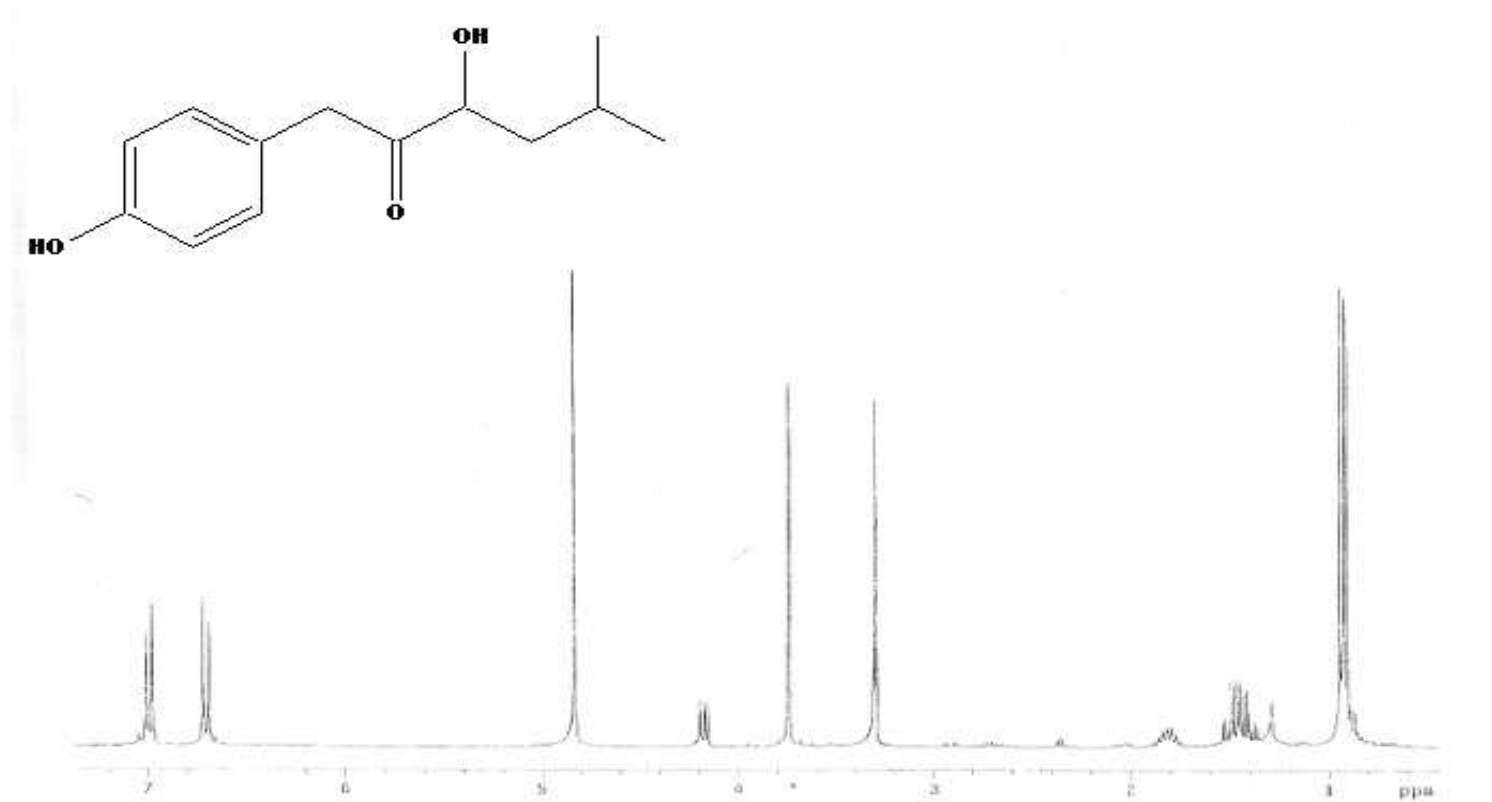
Yeast extract 0.3%, Malt extract 0.3%, Peptone 0.5%, Glucose 1%, Agar 1.5%, pH 7.2

MM 배지

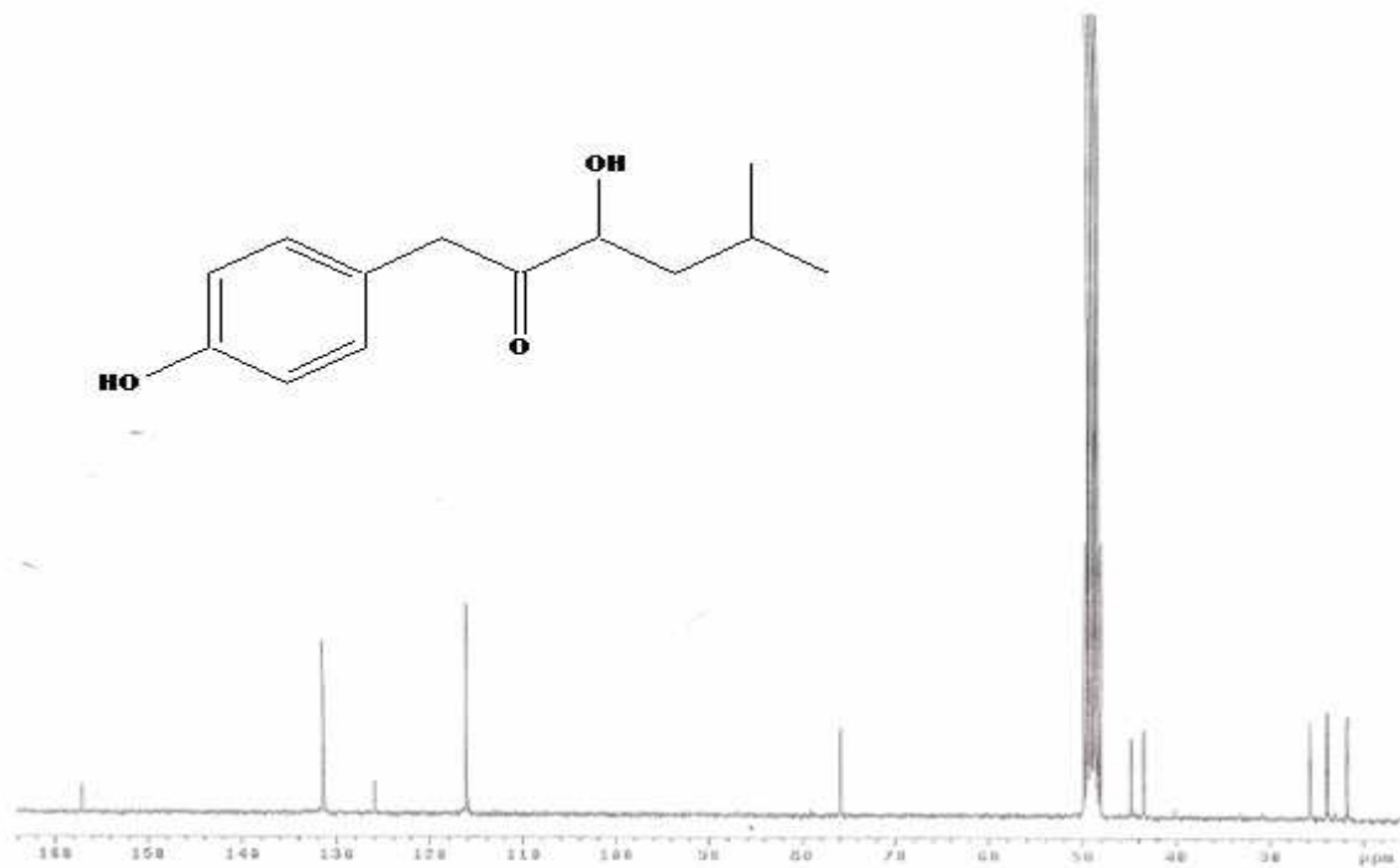
Peptone 0.5%, Yeast extract 0.3%, Beef extract 0.15%, Glucose 0.1%, Agar 1.5%, pH 7.4

2. NMR spectral data

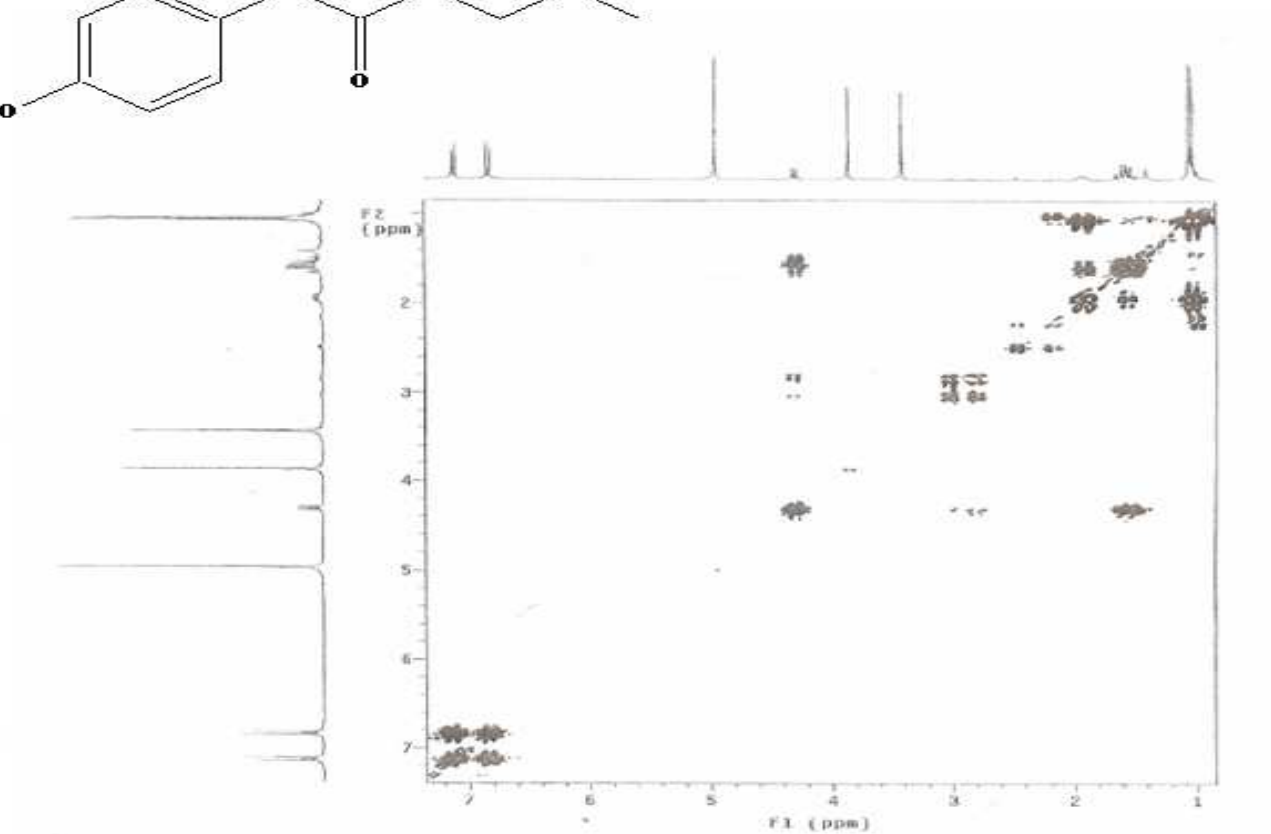
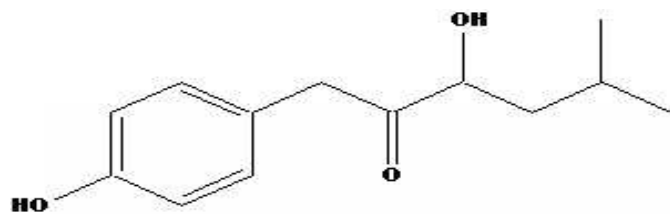
© Soraphinol C



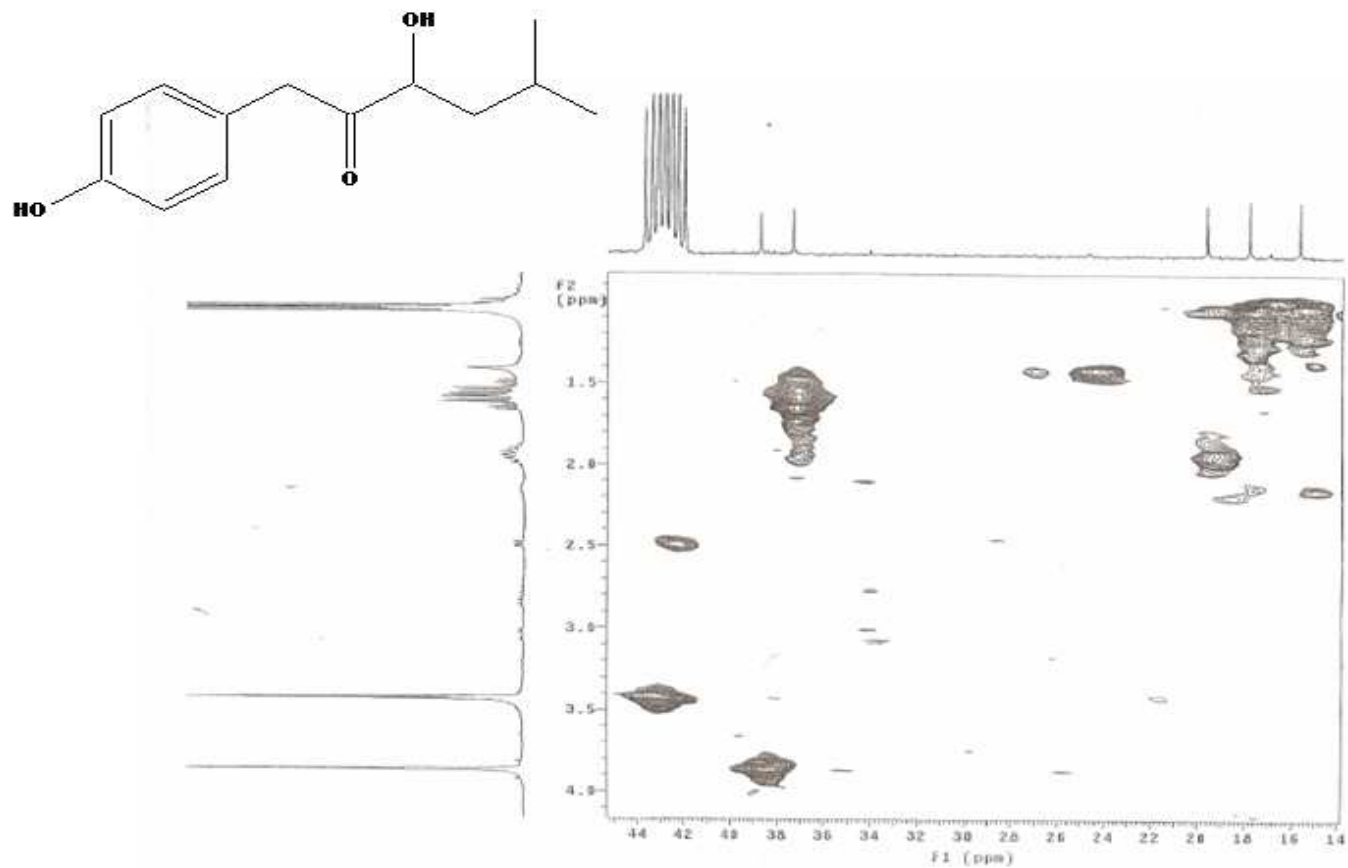
^1H NMR spectrum of Soraphinol C.



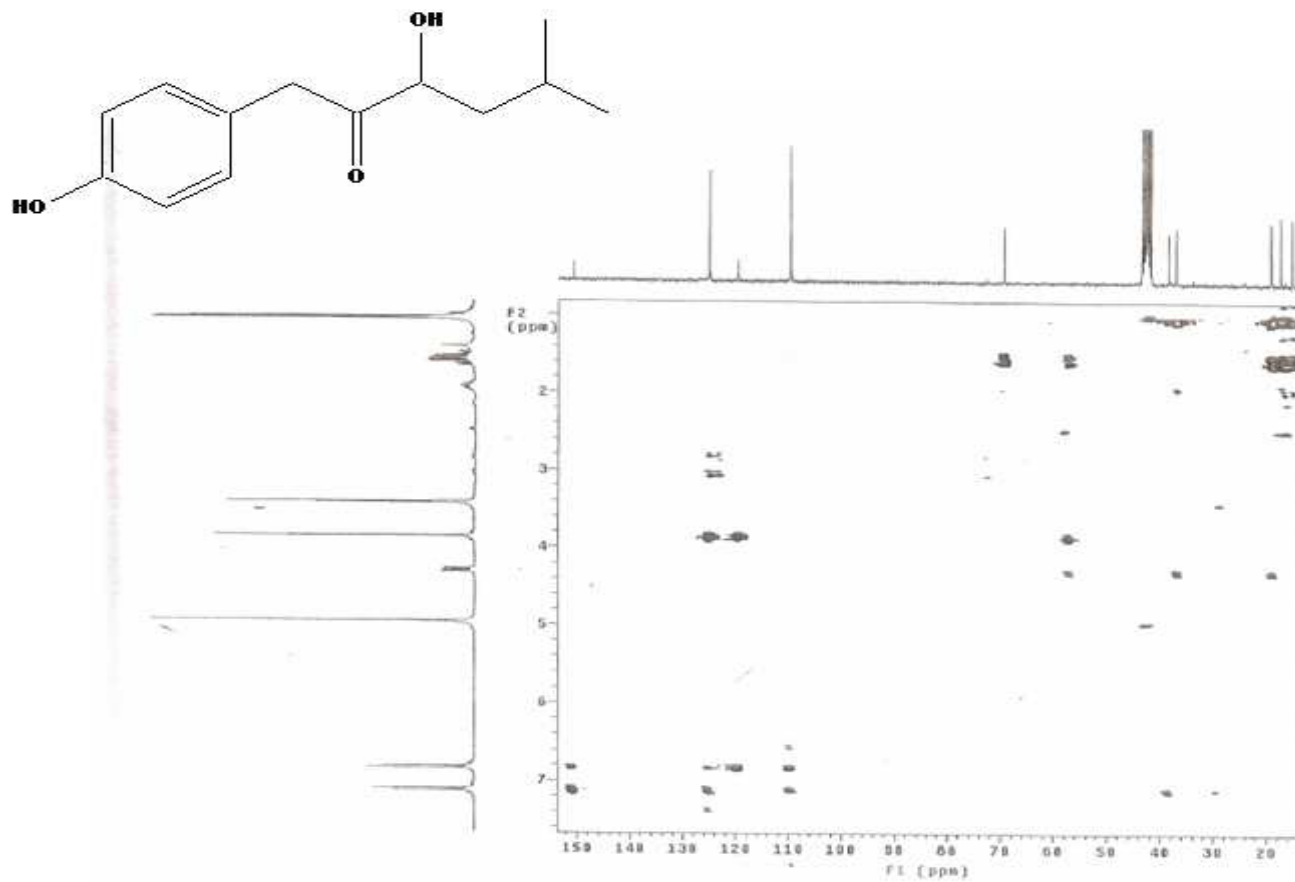
^{13}C NMR spectrum of Soraphinol C.



^1H - ^1H COSY spectrum of Soraphinol C.

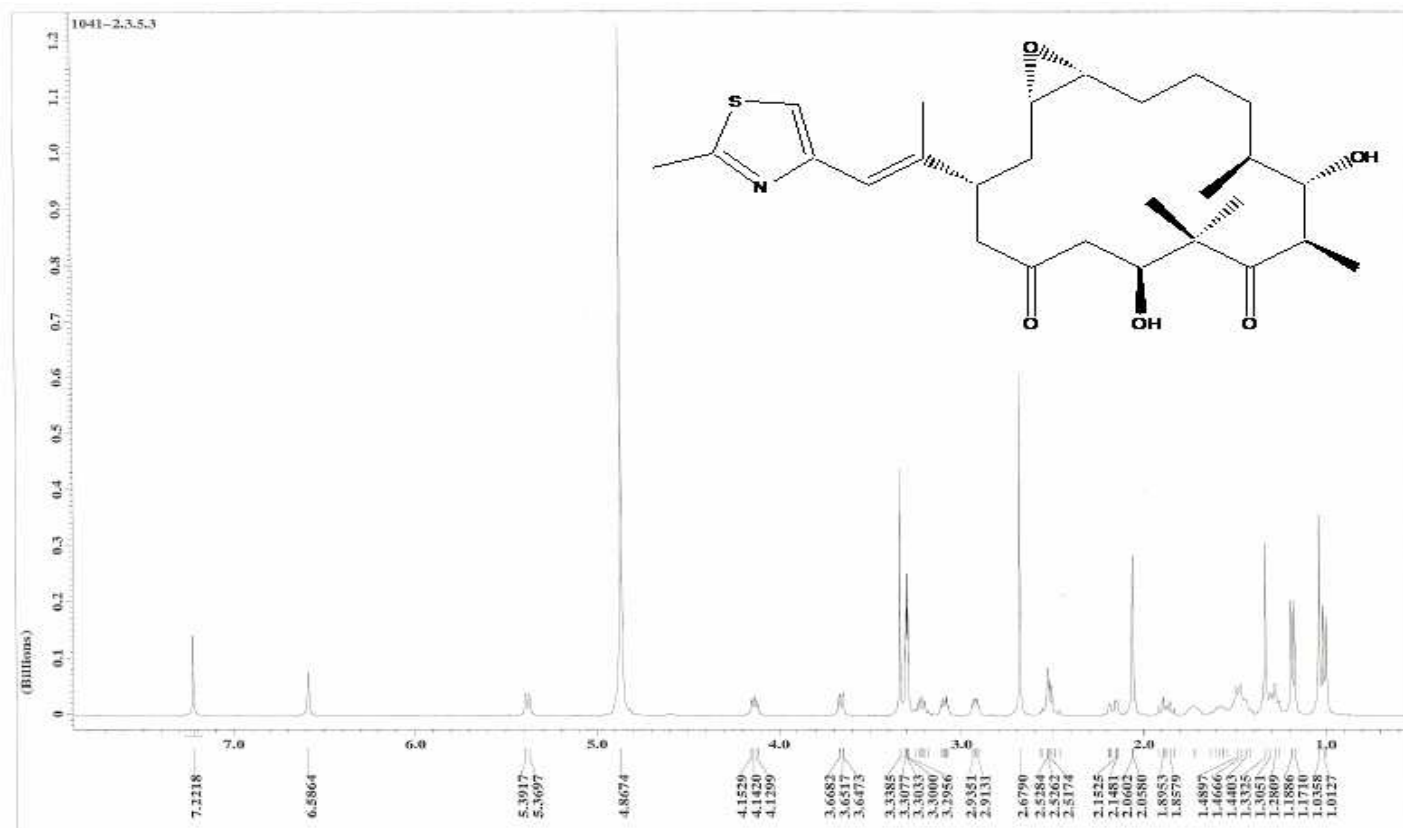


gHMQC spectrum of Soraphinol C.

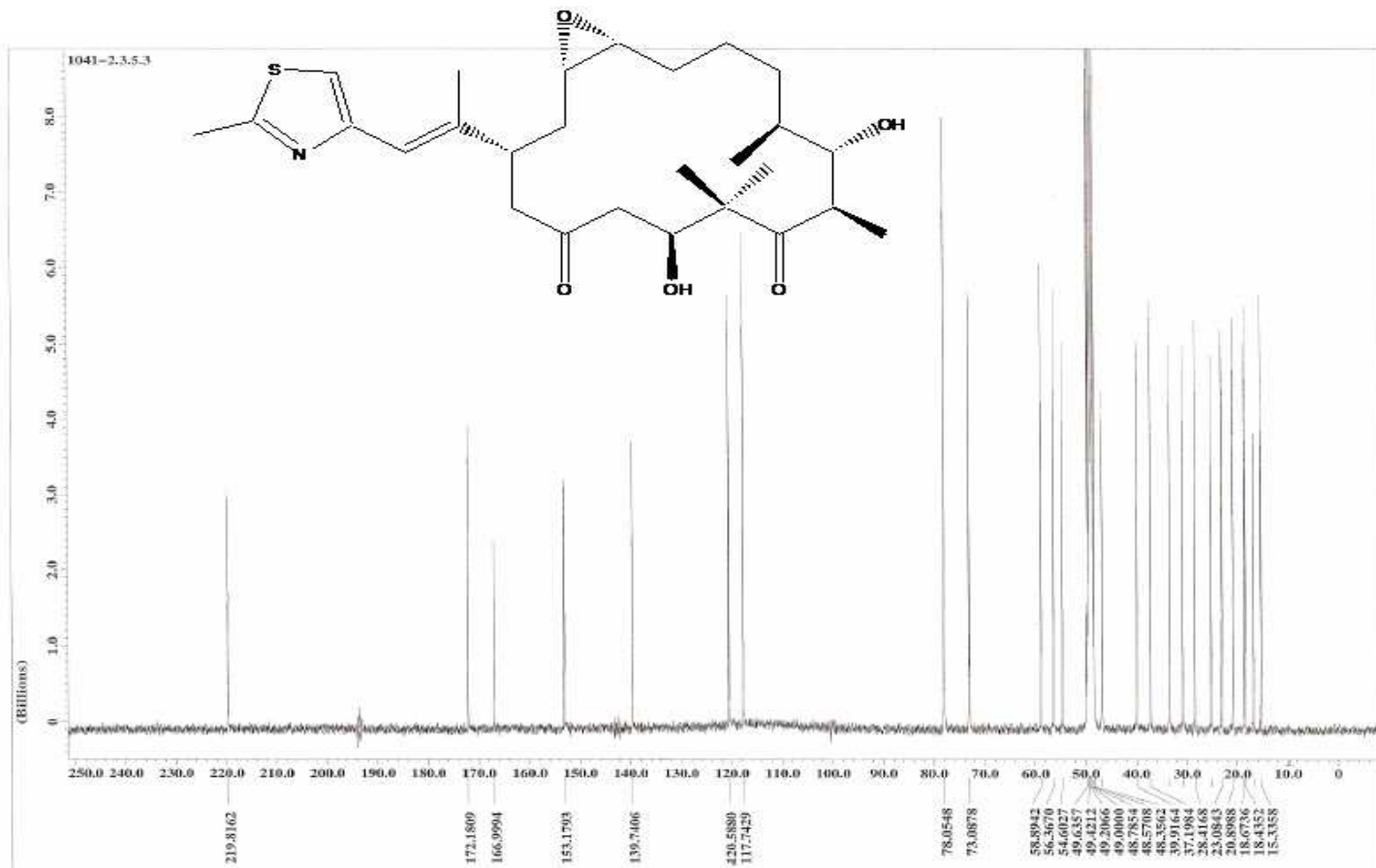


gHMBC spectrum of Soraphinol C.

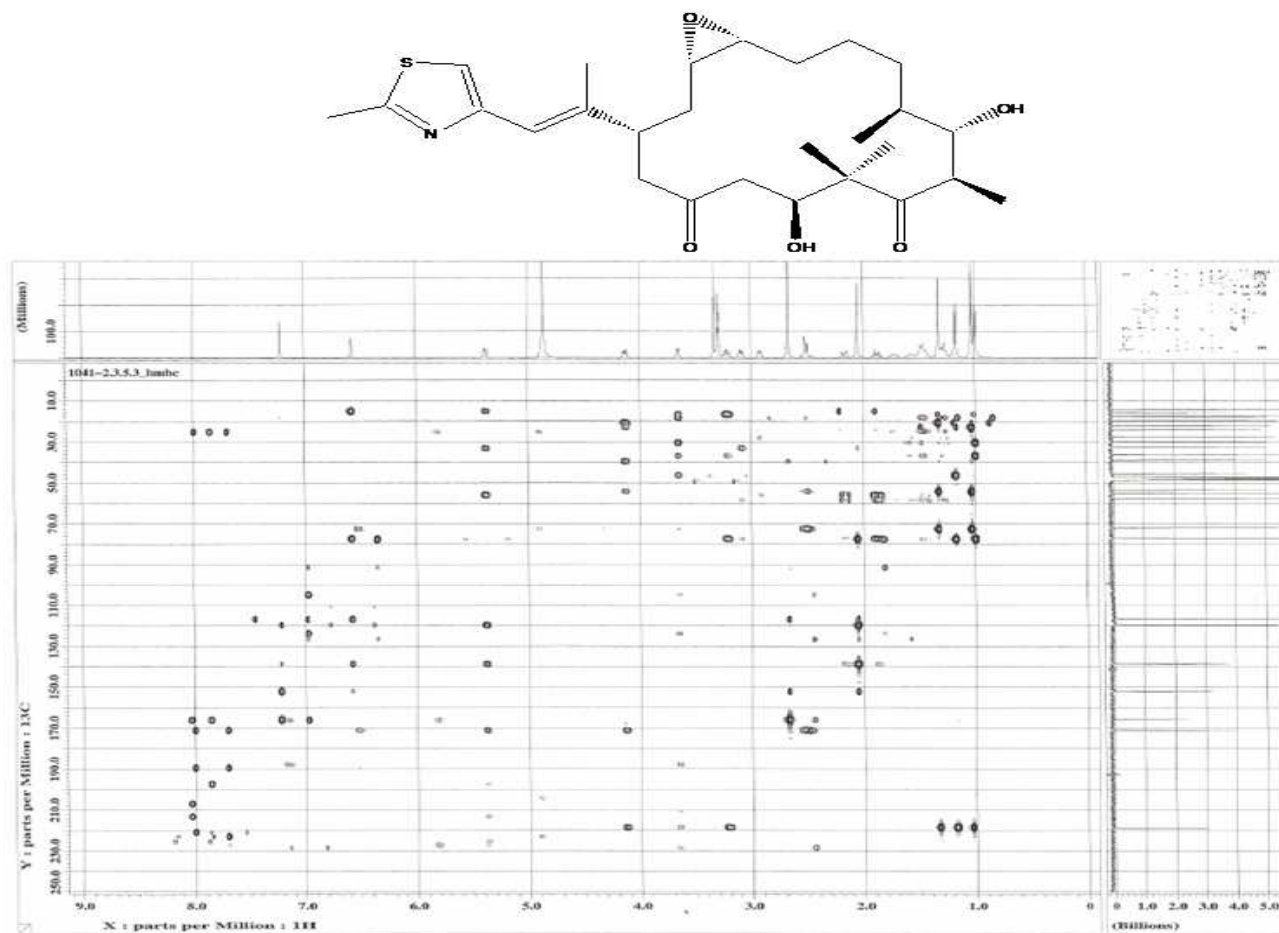
© Epothilone A



^1H NMR spectrum of Epothilone A.

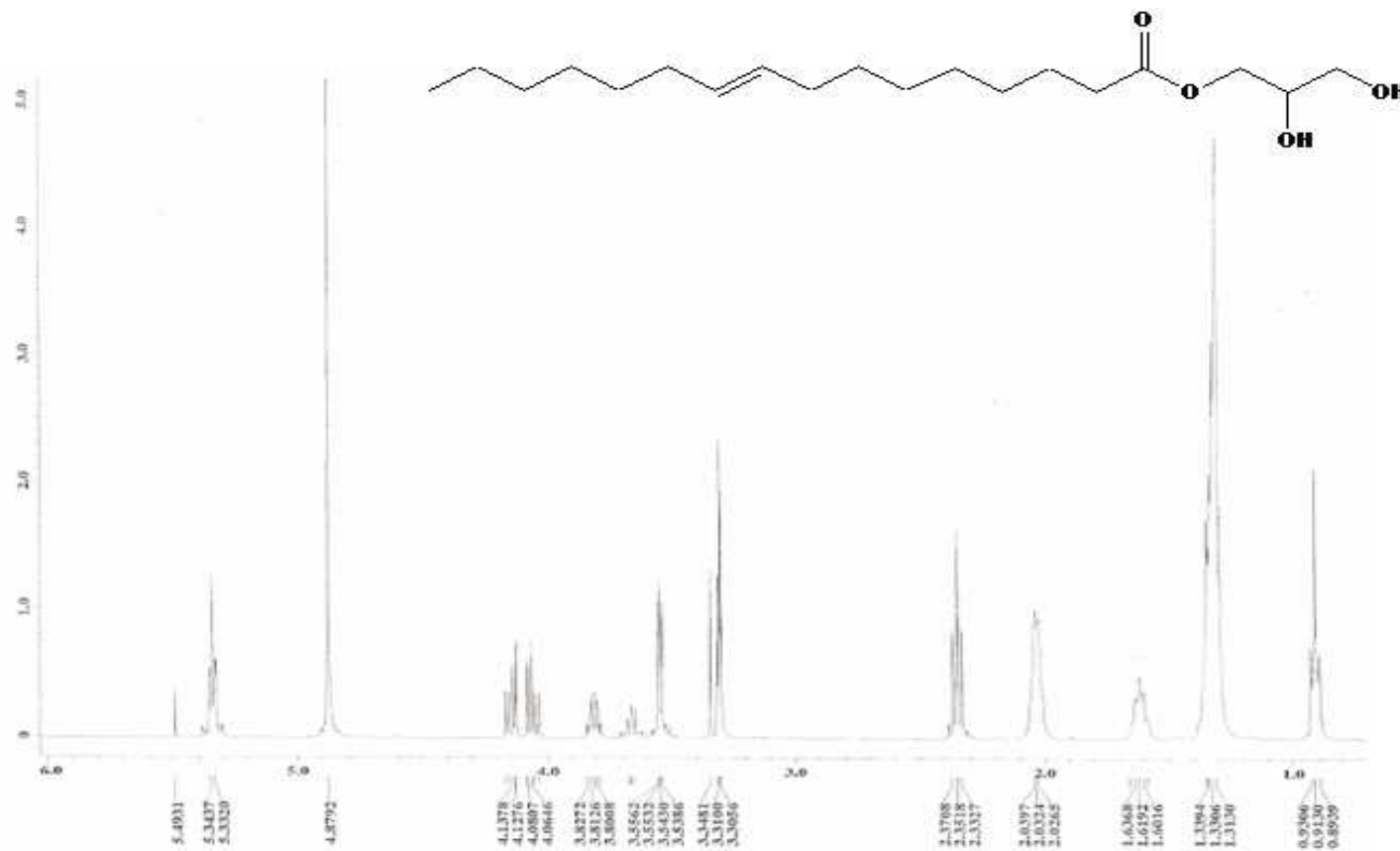


¹³C NMR spectrum of Epothilone A.

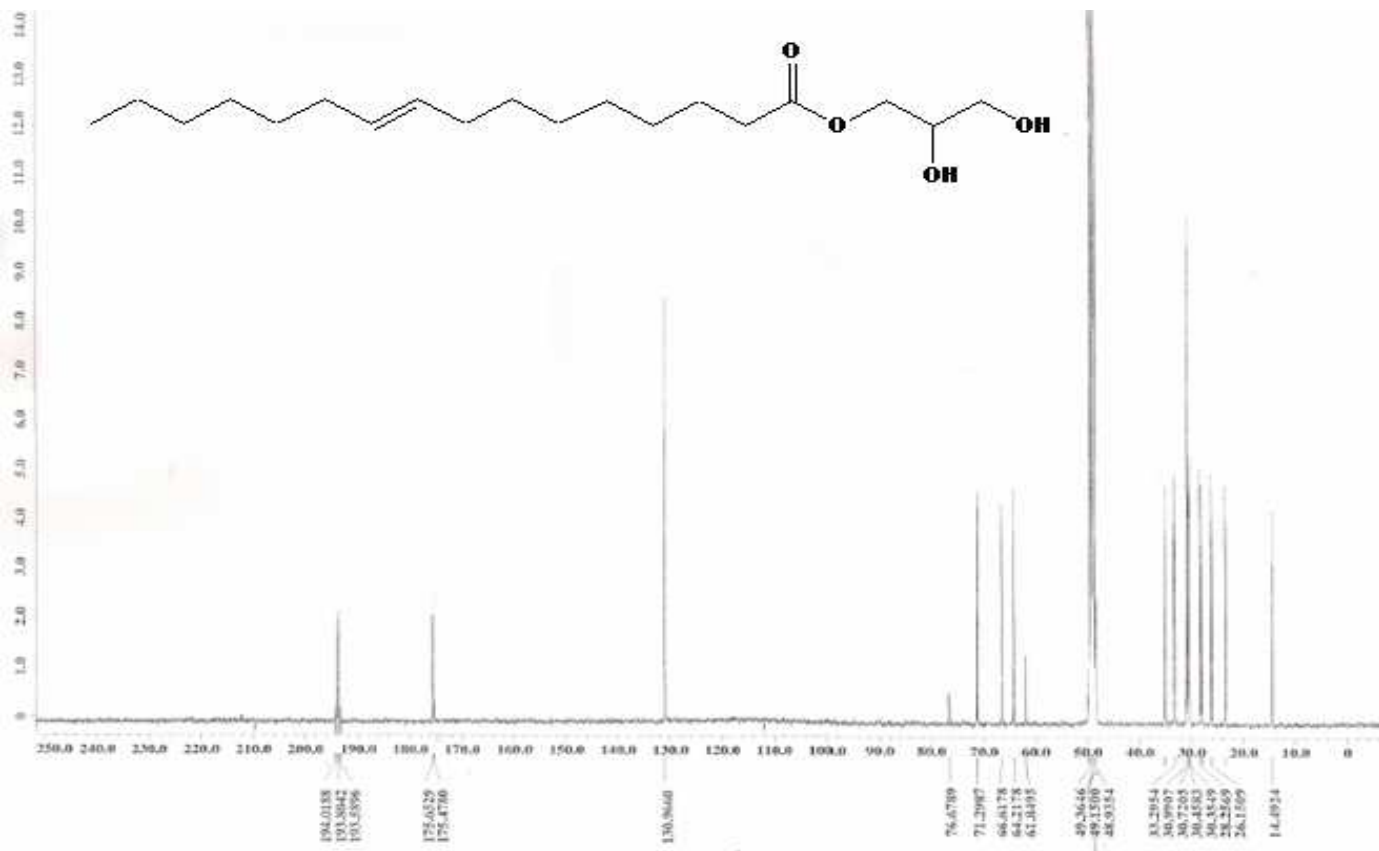


HMBC spectrum of Epothilone A.

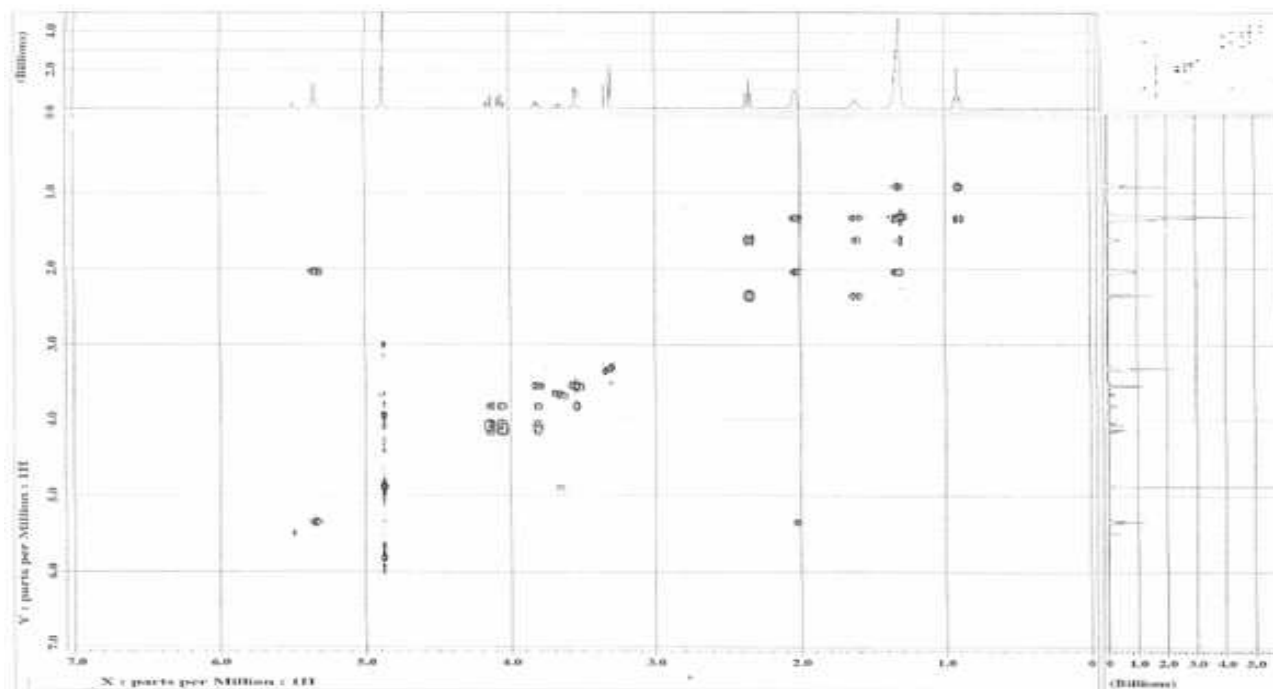
© Glycerol1-(9-hexadecenoate)



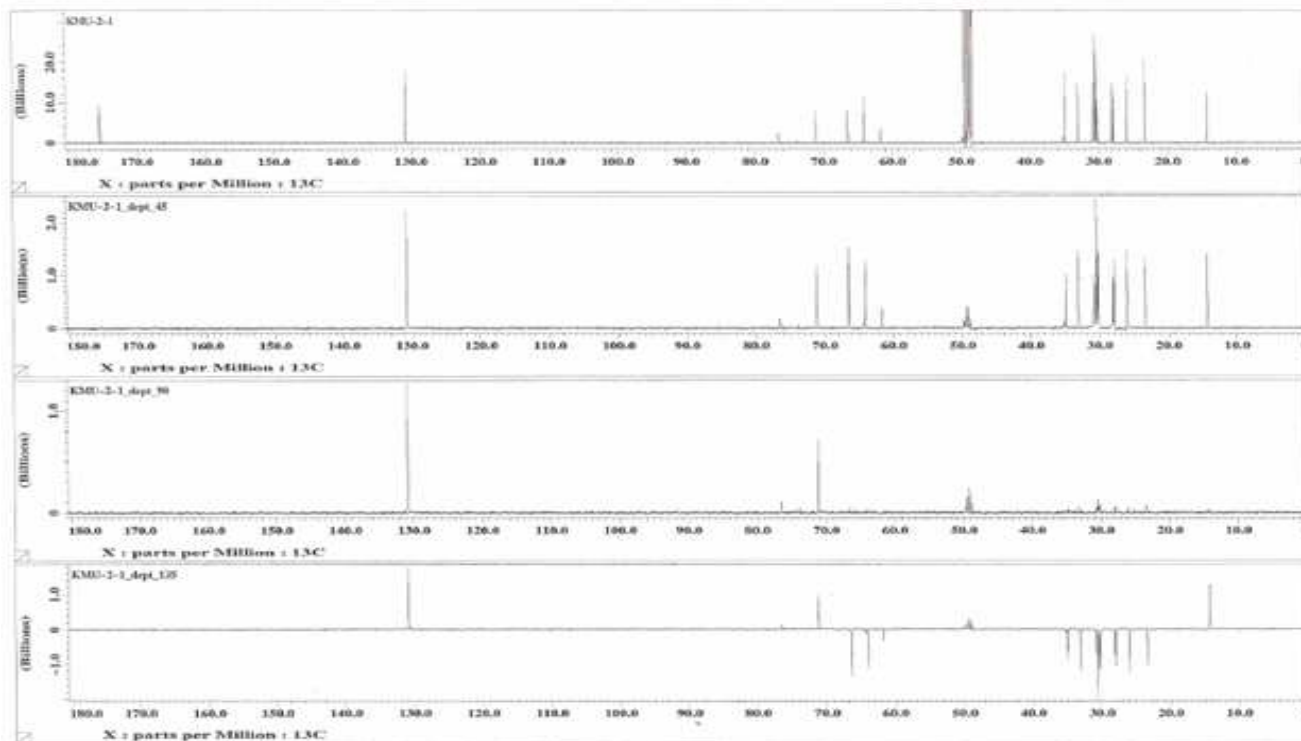
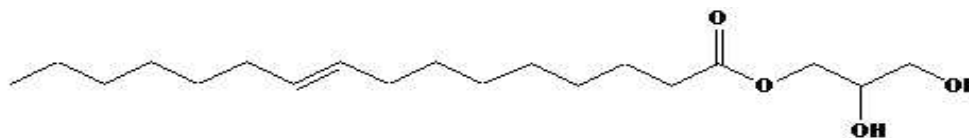
^1H NMR spectrum of Glycerol1-(9-hexadecenoate).



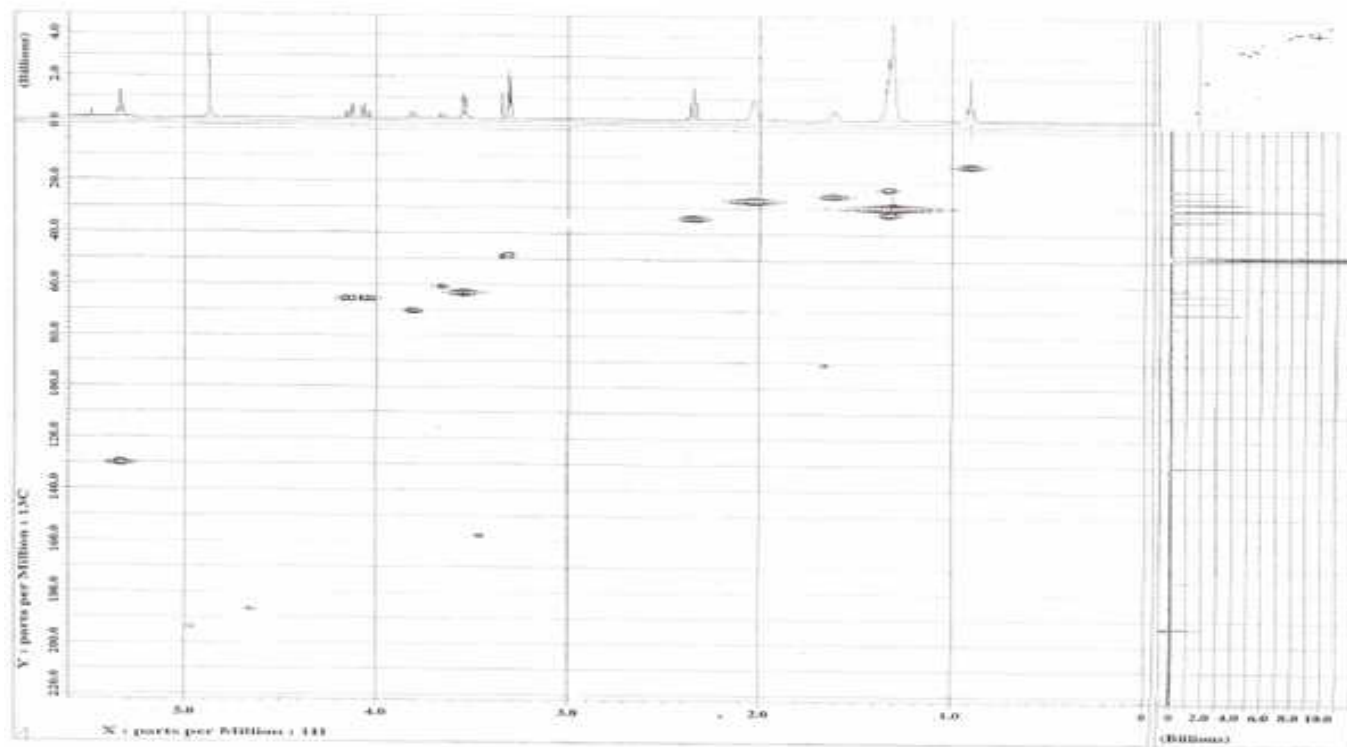
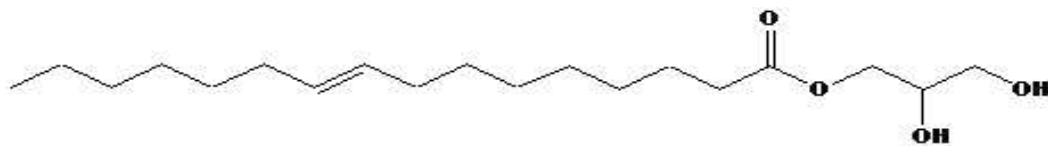
¹³C NMR spectrum of Glycerol 1-(9-hexadecenoate).



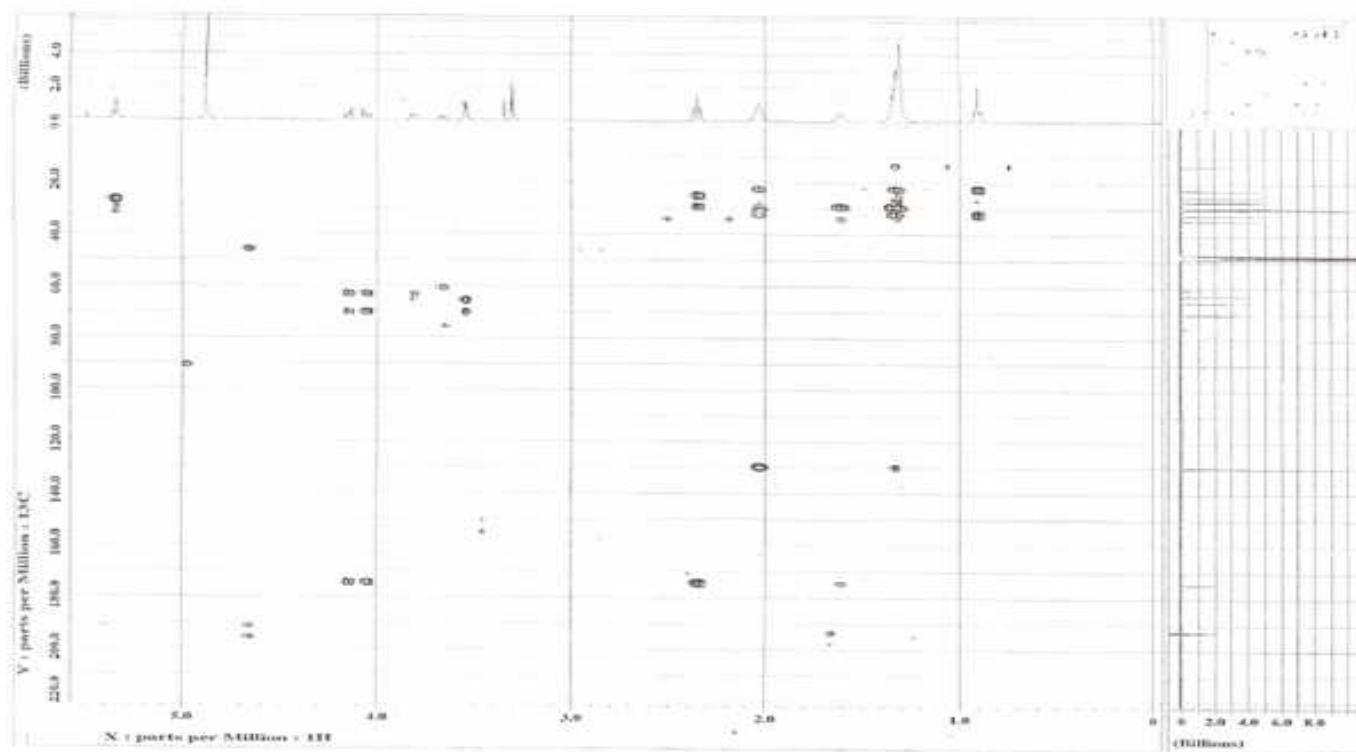
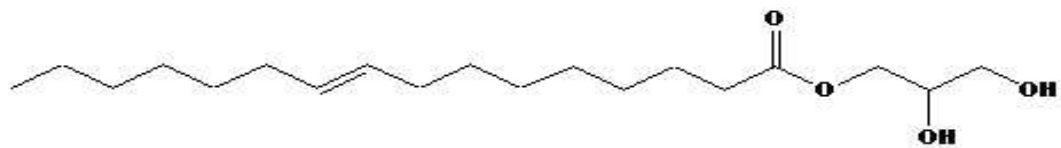
^1H - ^1H COSY spectrum of Glycerol 1-(9-hexadecenoate).



DEPT spectrum of Glycerol1-(9-hexadecenoate).

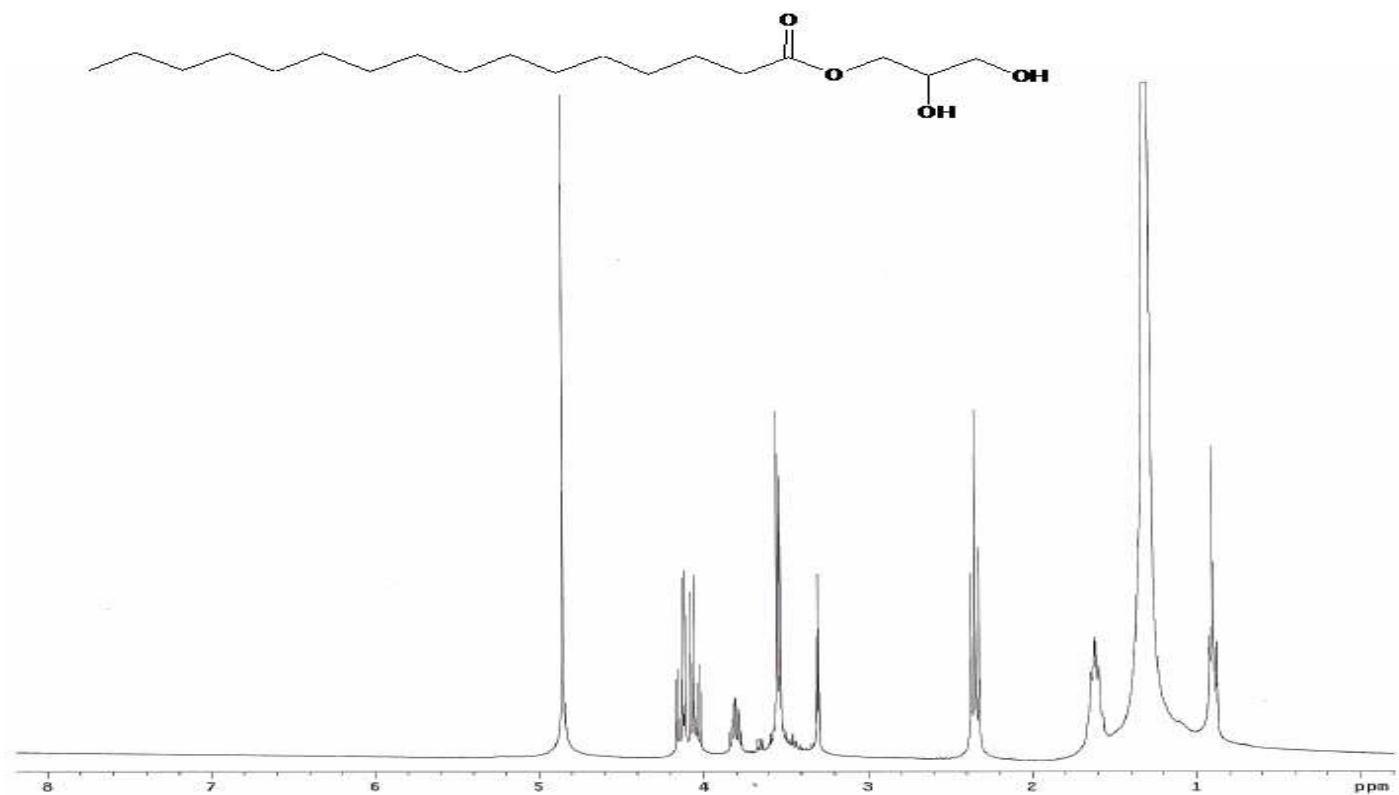


HMQC spectrum of Glycerol1-(9-hexadecenoate).

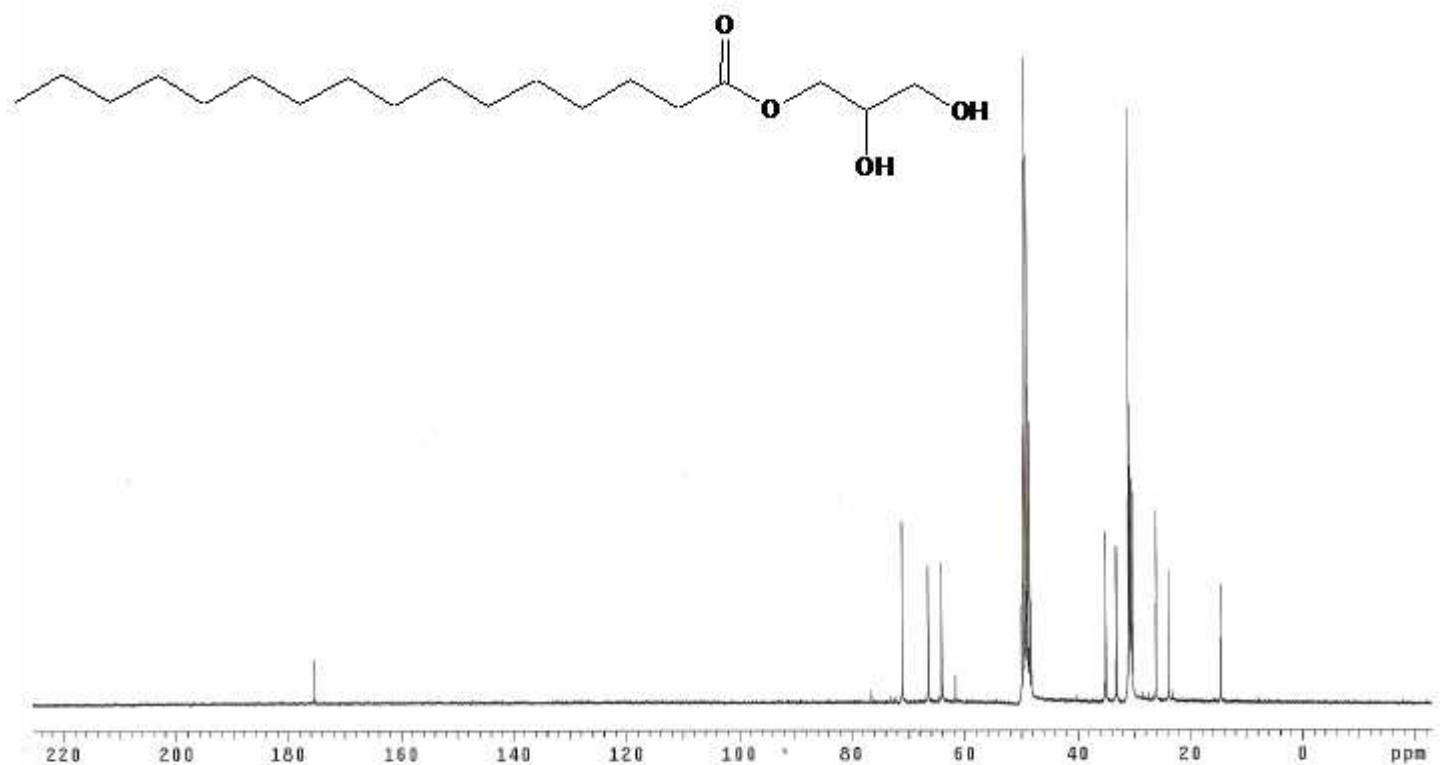


HMBC spectrum of Glycerol1-(9-hexadecenoate).

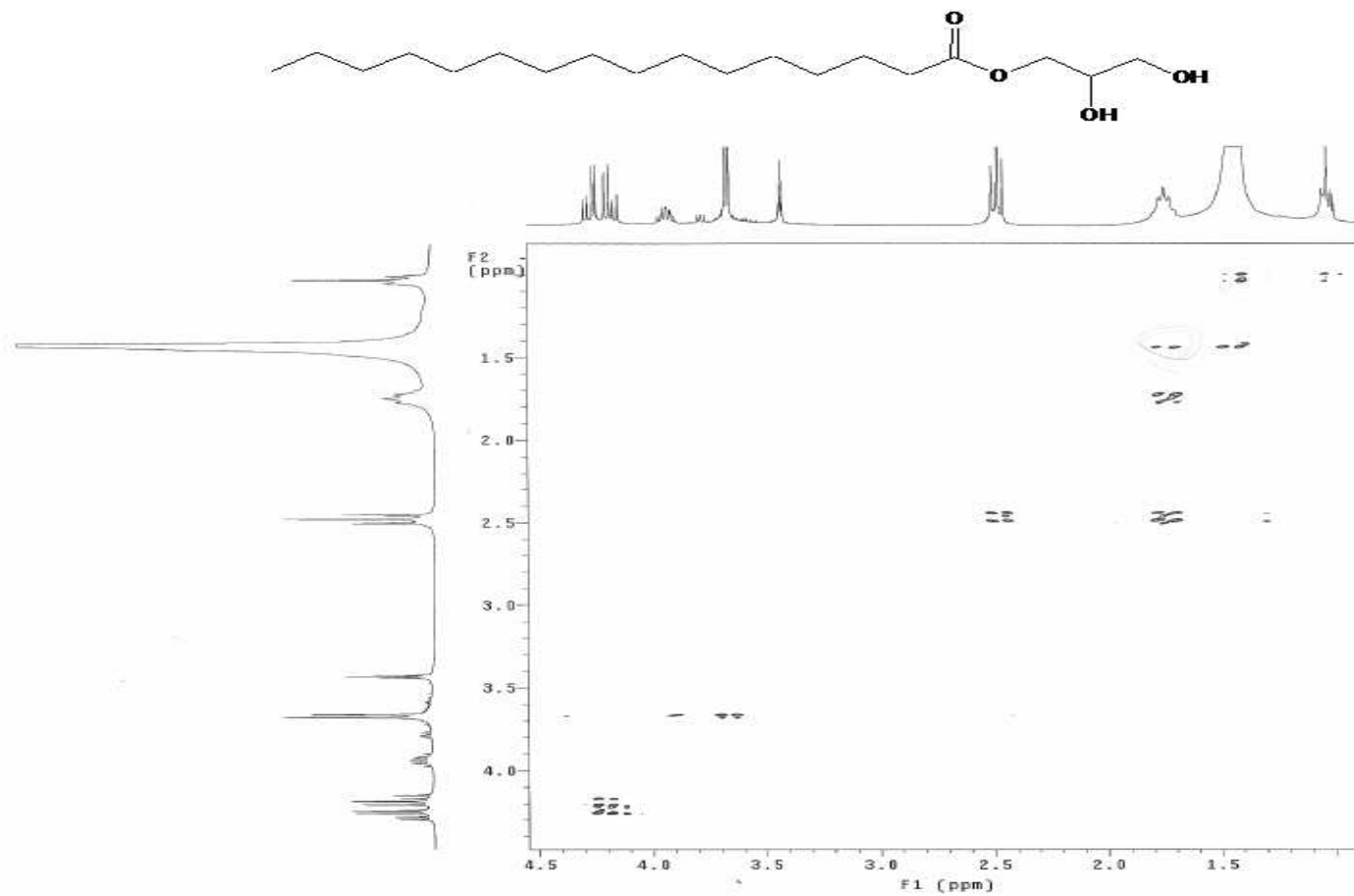
© Palmitin



^1H NMR spectrum of Palmitin.

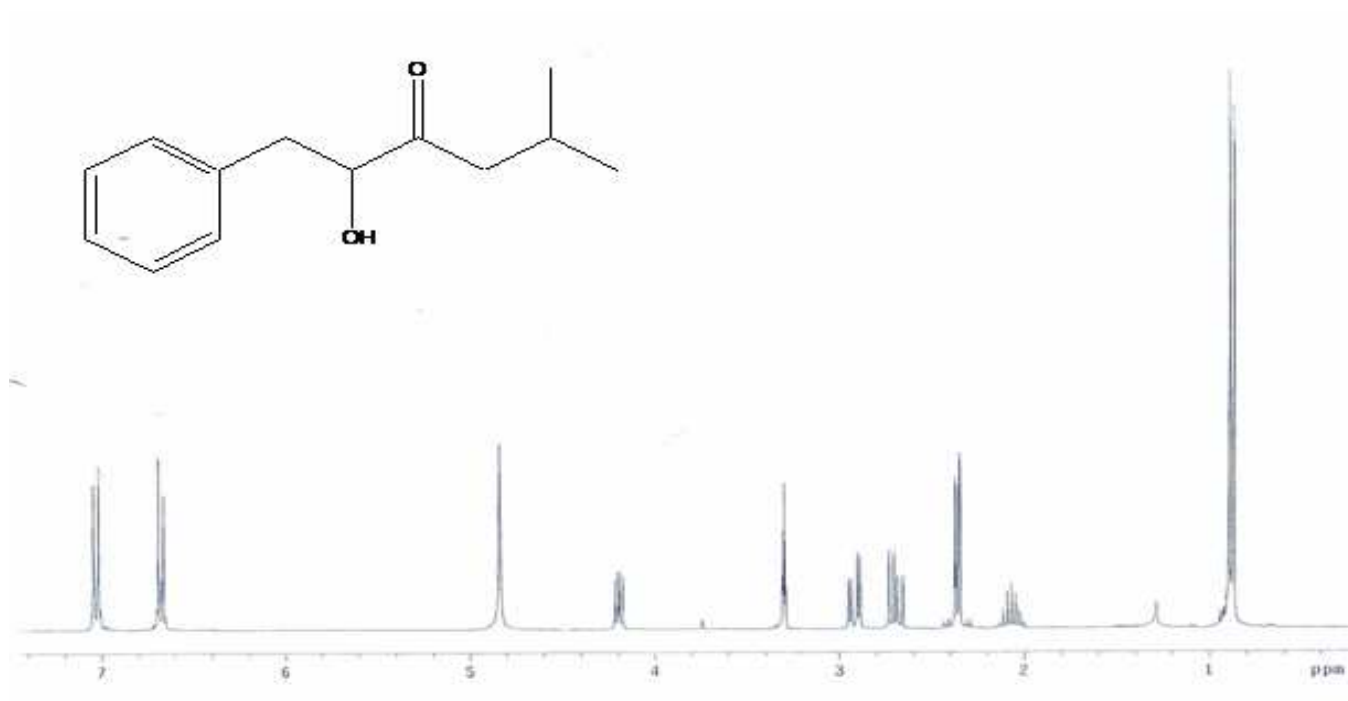


^{13}C NMR spectrum of Palmitin.

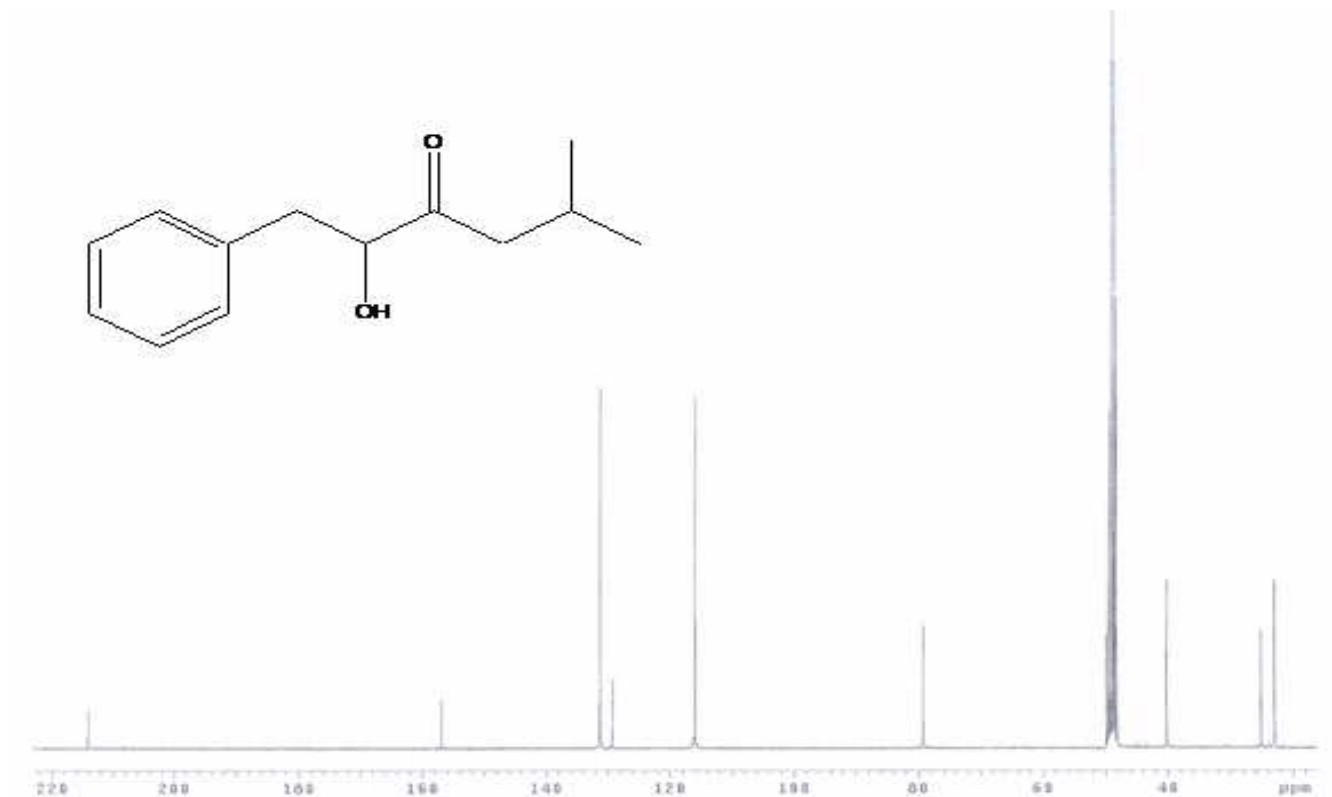


^1H - ^1H COSY spectrum of Palmitin.

© 4-hydroxylsattabacin



^1H NMR spectrum of 4-hydroxylsattabacin.



^{13}C NMR spectrum of 4-hydroxylsattabacin.



gDQCOSY spectrum of 4-hydroxylsattabacin.

참 고 문 헌

1. J. P. Karwowski, G. N. Sunga, S. Kadam, and J. B. Mcalpine, 1996, A method for the selective isolation of *Myxococcus* directly from soil., *J. Ind. Microbiol.*, **16**, 230-236.
2. T. Iizuka, Y. Jojima, R. Fudou, S. Yamanaka, 1998, Isolation of myxobacteria from the marine environment., *FEMS Microbiology Letter.*, **169**, 317-322.
3. JP Karwowski, GN Sunga, S Kadam, JB McAlpine, 1996, A method for the selective isolation of *Myxococcus* directly from soil., *J. Ind. Microbiol.*, **16**, 230-236.
4. K. Gerth, S. Pradella, O. Perlova, S. Beyer, R. Möller, 2006, Myxobacteria: proficient producers of novel natural products with various biological activities-past and future biotechnological aspects with the focus on the genus *Sorangium*., *J. Biotech.*, **106**, 233-253.
5. M. Kopp, H. Irschik, F. Gross, O. Perlova, A. Sandmann, K. Gerth, R. Muller, 2004, Critical variation of conjugational DNA transfer into secondary metabolite multiproducing *Sorangium cellulosum* strain So ce12 and So ce56: development of a *mariner*-based transposon mutagenesis system., *J. Biotechnol.*, **107**, 29-40.
6. Ingo H. Hardt, H. Steinmetz, K. Gerth, F. Sasse, H. Reichenbach, G. Höfle, 2001, New Natural Epothilones from *Sorangium cellulosum*, Strains So ce90/B2 and So ce90/D13: Isolation, Structure Elucidation, and SAR Studies., *J. Nat. Prod.*, **64**, 847-856.
7. K. C. Nicolaou, S. Ninkovic, F. Sarabia, D. Vourloumis, He, H. Vallberg, M. R. V. Finlay, Z. Yang, 1997, Total Syntheses of Epothilones A and B via a Macrolactonization-Based Strategy., *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 7974-7991.
8. G. Höfle, N. Bedorf, H. Steinmetz, D. Schomburg, K. Gerth, H. Reichenbach, 1996, Epothilone A and B-Novel 16-Membered Macrolides with Cytotoxic Activity: Isolation, Crystal Structure and Conformation in Solution, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **35**, 1567-1569.

9. Daniel M. Bollag, Patricia A. McQueney, J. Zhu, O. Hensens, L. Koupal, J. Liesch, M. Goetz, E. Lazarides, Catherine M. Woods, 1995, Epothilones, a New Class of Microtubule-stabilizing Agents with a Taxol-like Mechanism of Action., *Cancer Res.*, **55**, 2325-2333.
10. Richard J. Kowalski, P. Giannakakou, E. Hamel, 1997, Activities of the Microtubules-stabilizing Agents Epothilones A and B with Purified Tubulin and in Cells Resistant to Paclitaxel (Taxol[®])., *J. Bio. Chem.*, **272**, 2534-2541.
11. Sang Jun S., Sang Woo P., 2005, Development Trends of Next Generation Anticancer Drug, Epothilones. *Prospectives of Industrial Chemistry.*, **8**, 1-11.
12. F. Sasse, H. Steinments, J. Heil, and G. Höfle, 2000, Tubulysins, New Cytostatic Peptides from *Myxobacteria* Acting on Microtubule Production, Isolation, Physico-chemical and Biological Properties., *J. Antibiot.*, **53**, 879-885.
13. K. Gerth, N. Bedorf, G. Höfle, H. Irschik, 1996, Epothilons A and B: Antifungal and Cytotoxic Compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria) Production, Physico-chemical and Biological Properties., *J. Antibiot.*, **49**, 560-563.
14. J. W. Ahn, X. M. Li, O. P. Zee, 2007, Soraphinol B, A New Acyloin Compound Produced by *Sorangium cellulosum*., *Bull. Korean Chem. Soc.*, **28**, 1215-1216.
15. X. M. Li, O. P. Zee, H. J. Shin, Y. W. Seo, J. W. Ahn, 2007, Soraphinol A, a New Indole Alkaloid from *Sorangium cellulosum*., *Bull. Korean Chem. Soc.*, **28**, 835-836.
16. Ludger Wessjohann, 1997, Epothilones: Promising Natural Products with Taxol-Like Activity., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **36**, 715-718.
17. G. Lampis, D. Deidda, C. Maullu, Maria A. Madeddu, R. Pompei, 1995, Sattabacins and Sattazolins: New Biologically Active Compounds with Antiviral Properties Extracted from a *Bacillus* sp., *J. Antibiot.*, **48**, 967-972.
18. 조경연, 2001, Myxobacteria의 군집생활, 자실체 형성 및 생리활성물질의 생산., *생물산업*, **14**, 11-16.

19. 안종웅, 정영훈, 정유섭, 지옥표, 2002, The Discovery of Promising New Leaders for Anticancer Drug Development from Myxobacteria, 21세기 바이오 산업과 천연물과학 심포지움, 서울 대학교.
20. C. Wolgemuth, E. Hoiczky, D. Kaiser, G. Oster, 2002, How Myxobacteria Glide., *Current Biology.*, **12**, 369-377.
21. L. Koch, and D. White, 1998, The social lifestyle of myxobacteria., *Bioassays*, **20**, 1030-1038.
22. Mandy J. Ward, David R. Zusman, 1999, Motility in *Myxococcus xanthus* and its role in developmental aggregation., *Curr. Opin. Microbiol.*, **2**, 624-629.
23. Y. S. Kim, W. C. Bae, S. J. Beak, 2003, Bioactive Substances from Myxobacteria., *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, **31**, 1-12.
24. H. Reichenbach, 2001, Myxobacteria, producer of novel bioactive substances., *J. Ind. Microbiol.*, **27**, 149-156.
25. R. Jansen, H. Irschik, H. Meyer, H. Reichenbach, V. Wray, D. Schomburg, G. Höfle, 1995, Isolation and Structure Elucidation of Sorangiolides A and B, Novel Macrocyclic Lactone Carboxylic Acids from *Sorangium cellulosum*., *Liebigs Ann.*, 867-872.
26. J. Niggemann, N. Bedorf, U. Flörke, H. Steinmetz, K. Gerth, H. Reichenbach, G. Höfle, 2005, Spirangien A and B, Highly Cytotoxic and Antifungal Spiroketal from the Myxobacterium *Sorangium cellulosum*: Isolation, Structure Elucidation and Chemical Modifications., *Eur. J. Org. Chem.*, 5013-5018.
27. J. W. Ahn, S. H. Woo, C. O. Lee, K. Y. Cho, B. S. K., 1999, KR025, a new Cytotoxic compound from *Myxococcus fulvus*., *J. Nat. Prod.*, **62**, 495-496.
28. R. Jansen, H. Irschik, H. Reichenbach, V. Wray, G. Höfle, 1994, Disorazoles, Highly Cytotoxic Metabolites from the Sorangicin-Producing Bacterium *Sorangium cellulosum*, Strain So ce12., *Liebigs Ann. Chem.*, 759-773.

29. R. Jansen, H. Irschik, H. Reichenbach, V. Wray, G. Höfle, 1997, Chivosazoles A-F: Novel Antifungal and Cytotoxic Macrolides from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria)., *Liebigs Ann. Chem.*, 1725-1732.
30. H. Irschik, D. Schummer, K. Gerth, G. Höfle, H. Reichenbach, 1995, The Tartrolons, New Boron-containing Antibiotics from a Myxobacterium, *Sorangium cellulosum*., *J. Antibiot.*, **48**, 26-30.
31. H. Irschik, R. Jansen, K. Gerth, G. höfle, H. Reichenbach, 1995, Disorazol A, an Efficient Inhibitor of Eukaryotic Organisms Isolated from Myxobacteria., *J. Antibiot.*, **48**, 21-25.
32. H. Björn Bode, H. Irschik, Silke C. Wenzel, H. Reichenbach, G. Höfle, 2003, The Leupyrrins: A structurally Unique Family of Secondary Metabolites from the Myxobacterium *Sorangium cellulosum*., *J. Nat. Prod.*, **66**, 1203-1206
33. Cao, G., Alessio, C. P., Wu, A.H.B., Prior, R.L., 1995, Automated assay of oxygen radical absorbance capacity with the COBAS FARA II., *Clin. Chem.*, **41**, 1738-1744
34. Cao, G., Alessio, H. M., Culter, R., 1991. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants., *Free Radical Biol. Med.* **14**, 303-311.
35. Ou, B., Maureen, H-W., Prior, R.L., 2001, Development and Validarion of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe., *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 4619.
36. Rabian-Herzog C., Leage S., Gluckman E., Charron D., 1993, Characterization of lymphocyte subpopulations in cord blood., *J. Hematother.*, **2**, 255-257
37. M. Sefkow, G. Höfle. 1998. Substitutions at the Thiazole Moiety of Epothilone., *Heterocycles*, **48**, 2485-2488
38. C. Scott, Gareth W. Phillips and Anthony J. Baines, 2001, Properties of the C-terminal domain of 4.1 proteins., *Eur. J. Biochem.*, **268**, 3709-3717

39. Richard E. Taylor, Jaroslav Zajicek, 1999, Conformational Properties of Epothilone., *J. Org. Chem.* **64**, 7224-7228.
40. Sam F. Victory, David G. Vander Velde, Ravi K. Jalluri, Gray L. Grunewald, Gunda I. Georg, 1996, RELATIVE STEREOCHEMISTRY AND SOLUTION CONFORMATION OF THE NOVEL PACLITAXEL-LIKE ANTIMITOTIC AGENT EPOTHILONE A., *Bioorg. Med. Chem.Letts.*, **6**, 893-895.
41. H. Rechenbach, M. Dworkin, A. Balowsm, H. G. Truper, M. Dworkin (ed), 1992, The myxobacteria., The prokaryotes (2nd ed), Spriger verlag, New york, 3416-3487